

ZUR WIRKUNG VON CORTISOL
AUF VITAMIN-A-SÄURE-STIMULIERTE
EPIDERMISZELLEN IN VITRO

Hans-Jürgen Leutenmayr

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

Aus der dermatologischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. O. Braun-Falco

Zur Wirkung von Cortisol auf
Vitamin-A-Säure-stimulierte
Epidermiszellen in vitro

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Hans-Jürgen L e u t e n m a y r

aus

Augsburg

Jahr

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Christophers
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. O. Braun-Falco
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1977	



Total: 100,000

Einleitung	1
1. Die Bedeutung der Musik	2
2. Die Entwicklung der Musik	3
3. Die Musik als Kunst	4
4. Die Musik als Wissenschaft	5
5. Die Musik als Religion	6
6. Die Musik als Politik	7
7. Die Musik als Philosophie	8
8. Die Musik als Psychologie	9
9. Die Musik als Pädagogik	10
10. Die Musik als Medizin	11
11. Die Musik als Ethik	12
12. Die Musik als Ästhetik	13
13. Die Musik als Soziologie	14
14. Die Musik als Anthropologie	15
15. Die Musik als Kosmologie	16
16. Die Musik als Theologie	17
17. Die Musik als Metaphysik	18
18. Die Musik als Mystik	19
19. Die Musik als Magie	20
20. Die Musik als Alchemie	21
21. Die Musik als Astrologie	22
22. Die Musik als Numerologie	23
23. Die Musik als Geomantie	24
24. Die Musik als Palmariologie	25
25. Die Musik als Astrologie	26
26. Die Musik als Numerologie	27
27. Die Musik als Geomantie	28
28. Die Musik als Palmariologie	29
29. Die Musik als Astrologie	30
30. Die Musik als Numerologie	31
31. Die Musik als Geomantie	32
32. Die Musik als Palmariologie	33
33. Die Musik als Astrologie	34
34. Die Musik als Numerologie	35
35. Die Musik als Geomantie	36
36. Die Musik als Palmariologie	37
37. Die Musik als Astrologie	38
38. Die Musik als Numerologie	39
39. Die Musik als Geomantie	40
40. Die Musik als Palmariologie	41
41. Die Musik als Astrologie	42
42. Die Musik als Numerologie	43
43. Die Musik als Geomantie	44
44. Die Musik als Palmariologie	45
45. Die Musik als Astrologie	46
46. Die Musik als Numerologie	47
47. Die Musik als Geomantie	48
48. Die Musik als Palmariologie	49
49. Die Musik als Astrologie	50
50. Die Musik als Numerologie	51
51. Die Musik als Geomantie	52
52. Die Musik als Palmariologie	53
53. Die Musik als Astrologie	54
54. Die Musik als Numerologie	55
55. Die Musik als Geomantie	56
56. Die Musik als Palmariologie	57
57. Die Musik als Astrologie	58
58. Die Musik als Numerologie	59
59. Die Musik als Geomantie	60
60. Die Musik als Palmariologie	61
61. Die Musik als Astrologie	62
62. Die Musik als Numerologie	63
63. Die Musik als Geomantie	64
64. Die Musik als Palmariologie	65
65. Die Musik als Astrologie	66
66. Die Musik als Numerologie	67
67. Die Musik als Geomantie	68
68. Die Musik als Palmariologie	69
69. Die Musik als Astrologie	70
70. Die Musik als Numerologie	71
71. Die Musik als Geomantie	72
72. Die Musik als Palmariologie	73
73. Die Musik als Astrologie	74
74. Die Musik als Numerologie	75
75. Die Musik als Geomantie	76
76. Die Musik als Palmariologie	77
77. Die Musik als Astrologie	78
78. Die Musik als Numerologie	79
79. Die Musik als Geomantie	80
80. Die Musik als Palmariologie	81
81. Die Musik als Astrologie	82
82. Die Musik als Numerologie	83
83. Die Musik als Geomantie	84
84. Die Musik als Palmariologie	85
85. Die Musik als Astrologie	86
86. Die Musik als Numerologie	87
87. Die Musik als Geomantie	88
88. Die Musik als Palmariologie	89
89. Die Musik als Astrologie	90
90. Die Musik als Numerologie	91
91. Die Musik als Geomantie	92
92. Die Musik als Palmariologie	93
93. Die Musik als Astrologie	94
94. Die Musik als Numerologie	95
95. Die Musik als Geomantie	96
96. Die Musik als Palmariologie	97
97. Die Musik als Astrologie	98
98. Die Musik als Numerologie	99
99. Die Musik als Geomantie	100
100. Die Musik als Palmariologie	101

Meinen Eltern und
meiner Frau gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0100

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	S. 1
Einführung und Überblick	S. 3
1. Glucocorticoide	S. 3
2. Vitamin-A-Säure	S. 12
3. Thymidin	S. 21
Material und Methoden	S. 22
1. Chemikalien	S. 22
2. Materialien	S. 23
3. Tiere	S. 24
4. Zellgewinnung	S. 24
5. Anlegen der Zellkulturen	S. 25
6. Messung der ³ H-TdR-Einbaurate	S. 25
Ergebnisse	S. 28
1. Dosisabhängigkeit der Vitamin-A-Säure- Stimulation	S. 28
2. Zeitabhängigkeit der Vitamin-A-Säure- Stimulation	S. 30
3. Wirkung von Hydrocortison auf die mitotische Aktivität von Epidermiszellen	S. 33
a) Dosis-Wirkungsbeziehung	S. 33
b) Dosis-Zeitbeziehung	S. 37
Diskussion	S. 43
Zusammenfassung	S. 51
Literaturhinweise	S. 53

Einleitung

Der molekulare Wirkungsmechanismus von Glucocorticoiden ist in letzter Zeit Gegenstand intensiver in vivo- (15, 28, 53, 64, 79) wie auch in vitro- (15, 33, 35, 45, 63, 95) Untersuchungen. Während sich die in vivo-Untersuchungen vorwiegend mit den physiologischen Auswirkungen und den therapeutischen Möglichkeiten einer Steroidanwendung befassen, suchen die in vitro-Untersuchungen näheren Einblick in die biochemischen Mechanismen zu gewinnen, auf Grund derer die Hormone wirksam werden. Ihr Bestreben ist es, die Vorgänge auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu erhellen.

Drei Zelltypen - Hepatozyten, Lymphoidzellen und Fibroblasten - erwiesen sich hierbei als primär sensitiv gegenüber den Glucocorticoiden. Deshalb sind auch die Forschungen bei diesen drei Gewebetypen am weitesten vorangetrieben, und es liegen eine große Anzahl von Einzelergebnissen vor (5, 6, 8, 9, 35, 37, 38, 39, 43, 45, 52, 63, 66, 70, 73, 76, 77, 82, 83, 85, 89, 100, 102, 103, 107). Jedoch wurden auch andere Zelltypen einer Untersuchung über ihr Verhalten gegenüber Glucocorticoiden unterzogen, wie z.B. fetale Lungenzellen (95), Epithelzellen der Brustdrüse (33, 65), Knorpelzellen (4, 87) und Melanozyten (90). Vor allem untersuchte man, wie sich die Zelltypen unter Cortisoleinfluß in ihrem Wachstum verhalten. Ferner interessierte, wie sich

verschiedene biologische Parameter, z.B. Produktion bestimmter Enzyme, unter Cortisoleinfluß verändern.

Die Corticosteroide gehören heute zu den meistgebrauchten Lokalthérapeutika. Daher ist es von großer Wichtigkeit, einen genauen Einblick in den Wirkungsmechanismus dieser Hormone zu besitzen. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Wirkung von Hydrocortison auf (Meerschweinchen-) Epidermiszellen. Bei der Überprüfung der Hydrocortisoneffekte auf Epidermiszellen suchten wir Antwort auf zwei Fragen zu finden:

1. Wie verhalten sich Epidermiszellen in ihrem Wachstum, die dem stimulierenden Einfluß der Vitamin-A-Säure und gleichzeitig dem Einfluß des Hydrocortisons ausgesetzt sind?
2. Nach welcher Zeit tritt der Hemmeffekt des Hydrocortisons im Wachstum der Epidermiszellen auf?

Gleichzeitig untersuchten wir die Empfindlichkeit gegen verschieden hohe Cortisolkonzentrationen und verglichen diese Ergebnisse mit Empfindlichkeitsangaben in anderen Literaturstellen.

Einführung und Überblick

1. Glucocorticoide

Hydrocortison (syn. Cortisol) wird neben dem Corticosteron und dem Aldosteron von den Nebennierenrinden ausgeschüttet. Die physiologisch normale Ausschüttung beträgt pro Tag ca. 10 - 20 mg. Im Blut werden die Hormone an das Protein Transcortin gebunden transportiert und an die Zellen herangebracht.

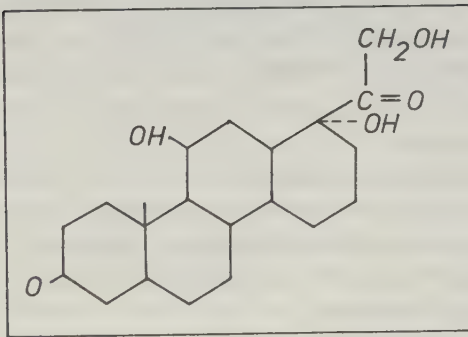


Abb. 1: Hydrocortison

⁴-Pregnen-11,17a, 21-triol-
3,20-dion

Die Steroid-Hormone lassen sich je nach dem Blickwinkel in verschiedene Gruppen einteilen. Betrachtet man die metabolischen Effekte, so gelangt man zu folgender

Einteilung (57):

1. Hormone, die anabole Effekte auslösen
(Androgene, Östrogene),
2. Hormone, die katabole Effekte auslösen
(Glucocorticoide: Cortisol, Corticosteron),
3. Hormone, die keine ausgesprochenen anabolen bzw.
katabolen Effekte auslösen, jedoch regulierend
in den Elektrolythaushalt eingreifen
(Mineralocorticoide: Aldosteron).

Betrachtet man jedoch die Steroid-Hormone im Rahmen eines speziellen Systems, wie zum Beispiel der Leber, so lassen sie sich einteilen nach ihrer Fähigkeit, das Enzym Tyrosinamino-Transaminase zu induzieren (85), in:

1. Optimale Induktoren, die das Enzym zu maximaler Aktivität stimulieren
(Cortisol, Dexamethason, Corticosteron),
2. Suboptimale Induktoren, die das Enzym submaximal, aber zu einer charakteristischen Aktivität induzieren und kompetitiv die Induktion durch die optimalen Induktoren hemmen
(11 β OH Progesteron, 11 desoxycortisol, Desoxycorticosteron),
3. Antiinduktoren, die das Enzym nicht induzieren können, die aber kompetitiv die Induktion durch die optimalen und suboptimalen Induktoren hemmen
(Testosteron, 17 α Methyltestosteron),
4. Inaktive Steroide, die weder induzieren, noch die Enzym-Induktion hemmen können.

Eine Untersuchung über die Aktivitäts-Strukturbeziehung der verschiedenen Steroidhormone (43) ergab, daß die 11 β -hydroxy-Gruppe im Cortisol von besonderer Wichtigkeit ist. Denn 11-desoxycortisol-Analoga - zum Beispiel Cortexolon - wiesen eine 20-fach niedrigere Aktivität auf, während 11 α -hydroxy-Analoga - zum Beispiel 11 Epicortisol - gar eine 200-fach niedrigere Aktivität besaßen. Eine Modifikation der natürlich vorkommenden Hormone durch Einfügen von ein bis zwei Doppelbindungen und Fluoratomen in den Positionen 6 und 9 ergeben die synthetischen Steroide Dexamethason und Fluocinolon. Daraus resultiert auch eine Zunahme der 'Killing-Aktivität' (= Hydrocortisone verursachen bei Lymphoidzellen eine Zell- und Kernlyse) auf den 10- bzw. 100-fachen Wert (43).

Die Glucocorticoide gehören nach ihren metabolischen Eigenschaften somit zu den katabolen Hormonen, da sie eine Abnahme der Proteinsynthese, insbesondere im Muskelgewebe, im Subcutangewebe und im Knochengewebe verursachen. Einen auffallend anabolen Effekt jedoch lösen diese Hormone in der Leber aus: Die Syntheserate der Leber-t-RNA (29, 75) steigt an, desgleichen die Leberproteinsynthese (29, 62). Die Glucose und Glykogenproduktion nimmt zu (19) und die Aktivität bestimmter Leberenzyme erhöht sich, woraus man schließen kann, daß sie vermehrt synthetisiert werden. Diese Aktivitätszunahme der Leber-Transaminasen (Tyrosin-Transaminase, Tryptophan-Transaminase, Phenylalanin- und Alanin-Transaminase) und der Tryptophan-Pyrrolase konnte in verschiedenen Arbeiten bestätigt werden (47, 54).

Die Aktivitätserhöhung bestimmter Leberenzyme verursacht jedoch gleichzeitig einen Abfall der Blutwerte an jenen Aminosäuren, die nun verstärkt in der Leber metabolisiert werden. Damit aber werden andere Organe, die auf die Blutzufuhr dieser Aminosäuren angewiesen sind, in ihrer Proteinsynthese beeinträchtigt. Diese anabolen Effekte in der Leber weisen auf eine Primärsensitivität der Hepatozyten gegenüber den Glucocorticoiden hin.

Wie durch in vivo- und in vitro-Untersuchungen gezeigt werden konnte, scheinen die Glucocorticoide offensichtlich einen diametral entgegengesetzten Effekt auf lymphoide Zellen auszuüben. Eine Glucocorticoidverabreichung löst bei Lymphozyten folgende Effekte aus:

1. Hemmung der Nuclein- und Proteinsynthese,
2. Hemmung der Aufnahme von Glucose und α -Amino-Buttersäure,
3. Zunahme der Freisetzung der Aminosäuren.

Diese zwei entgegengesetzten Glucocorticoideffekte auf zwei verschiedene Zielgewebe - Leber- und Lymphoidzellen - sind schwierig zu interpretieren, selbst wenn man nur einen ähnlichen, nicht identischen Mechanismus der Glucocorticoidwirkung in diesen Geweben annimmt (57).

Als weitere Zellen mit Primär-Sensitivität werden die Fibroblasten angesehen. Die Glucocorticoide besitzen in Gewebekulturen einen wachstumshemmenden Effekt auf Fibroblasten (41, 100). Dieser Effekt hängt

wahrscheinlich mit einer Hemmung der Nucleinsäure- und Proteinsynthese zusammen (100). Die Fibroblasten reagieren, ähnlich wie die Lymphoidzellen, mit einer Wachstumshemmung, im Gegensatz zu den Lymphozyten jedoch erfahren sie keine so schnelle Karyo- und Zellyse.

Als Zelltypen mit einer Primärsensitivität gegenüber den Glucocorticoiden kristallisieren sich somit heraus:

1. Hepatozyten
2. Lymphoidzellen
3. Fibroblasten

Ebenso paradoxe und sich widersprechende Ergebnisse brachten Untersuchungen über die Beziehungen zwischen den Glucocorticoiden und der Induktion maligner Tumoren hervor. Es zeigte sich, daß Glucocorticoide sowohl einen fördernden als auch einen hemmenden Effekt auslösen können (22, 43, 80, 81, 92). Dabei ist interessant, daß nicht die Dosis für den jeweiligen Effekt verantwortlich ist, sondern daß vielmehr der Grad der Wachstumshemmung von der Struktur der Steroide abhängt. So ist der wachstumshemmende Effekt in normalen und malignen Lymphoid-Zellen und in Fibroblasten genau korreliert mit jener oben erwähnten Aktivitäts-Strukturbeziehung der Steroide im Hinblick auf ihre Fähigkeit, in der Leber die t-RNA und Proteinsynthese auszulösen (43). Ferner ist die Hemmung des Wachstums von Hauttumoren bei Mäusen, die durch Dimethylbenzanthrazen induziert und

durch Krotonöl gefördert wurden, genau korreliert mit der antiinflammatorischen Wirksamkeit des Cortisols und seiner synthetischen Analoga (57). Geht man nun der Frage nach, wann Hydrocortison einen hemmenden oder einen fördernden Effekt auf Tumoren besitzt, so scheint folgender Sachverhalt vorzuliegen: Die Corticosteroide fördern bei gewissen Karzinogenen die Potenz zur Tumor-induktion, bei bestehenden Tumoren jedoch besitzen die Corticosteroide einen wachstumshemmenden Effekt (57). Um dies zu erklären, wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Corticosteroide bestimmte Enzyme induzieren, die für die Umwandlung dieser Karzinogene in ihre aktiven Metaboliten nötig sind. Bei einem bereits bestehenden Tumor jedoch hemmt eine Cortisolverabreichung - zum Beispiel bei einem Hepatom - drastisch die t-RNA- und Proteinsynthese und damit das Wachstum des Tumors (57). Der Befund der fördernden Wirkung läßt sich jedoch auch damit erklären, daß Corticosteroide (über die Hemmung des lymphatischen Systems) immunsuppressiv wirken und damit die immuno-logische Verteidigung des Wirtes herabsetzen.

Diese sich teilweise widersprechenden Glucocorticoid-effekte führten dazu, daß sich in jüngster Zeit die Forschungen mehr auf der subzellulären Ebene abspielen. Ziel ist es, jenes gemeinsame Verbindungsstück im Wirkungsmechanismus der Steroide zu finden, das dann alle folgenden, oft gänzlich unterschiedlichen biosynthetischen und metabolischen Effekte auslösen würde. Inzwischen wandte man sich deshalb der näheren Untersuchung der

Steroidrezeptoren zu, über die inzwischen bemerkenswerte Ergebnisse vorliegen.

Zunächst ließen sich für die drei Gruppen Steroidhormone - Sexualhormone, Glucocorticoide und Mineralocorticoide - in den verschiedenen Zielgeweben spezifische Rezeptoren nachweisen (49, 99). Weiterhin wurde gezeigt, daß die spezifische Steroid-Gewebe-Bindung korreliert ist mit der individuellen Empfindlichkeit der Organe gegenüber dem speziellen Steroid. Sharp et al. (91) fanden bei ihren Studien über die Bindung von ^3H -Aldosteron an die Krötenblase, daß es mindestens zwei verschiedene Rezeptortypen geben muß: spezifische Rezeptoren mit hoher Affinität und niedriger Kapazität und unspezifische Rezeptoren mit niedriger Affinität und hoher Kapazität. Man fand die spezifischen Rezeptoren im Kern und auch im Zytoplasma (57). Beweise für die Präsenz spezifischer Glucocorticoid-Rezeptoren wurden für verschiedene Zelltypen vorgelegt: Lymphozyten (59), Thymozyten (86), Fibroblasten (42) und für die Ratten-Leber (30).

Inzwischen wurden die Rezeptoren näher charakterisiert. Es handelt sich bei ihnen um Proteine (26, 69) mit einem Molekulargewicht zwischen 80 000 und 200 000, abhängig vom untersuchten Gewebe und der Meßmethode (57). Neben diesen spezifischen Rezeptoren fanden sich, wie schon erwähnt, unspezifische Rezeptoren, wobei noch keine sicheren Beweise vorliegen, in welchem Verhältnis diese beiden Typen zueinander stehen. Eine Hypothese für die Funktion der unspezifischen Rezeptoren geht dahin, daß

es sich um steroid-metabolisierende Enzyme handelt (57). Die spezifischen Rezeptoren wurden, wie oben gezeigt, sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachgewiesen. Wie es nach den bisher vorliegenden Ergebnissen scheint, kann man sich folgendes Zusammenspiel zwischen dem spezifischen Zytoplasma-Rezeptor und dem spezifischen Kern-Rezeptor vorstellen (57). (s. Abb. 2)

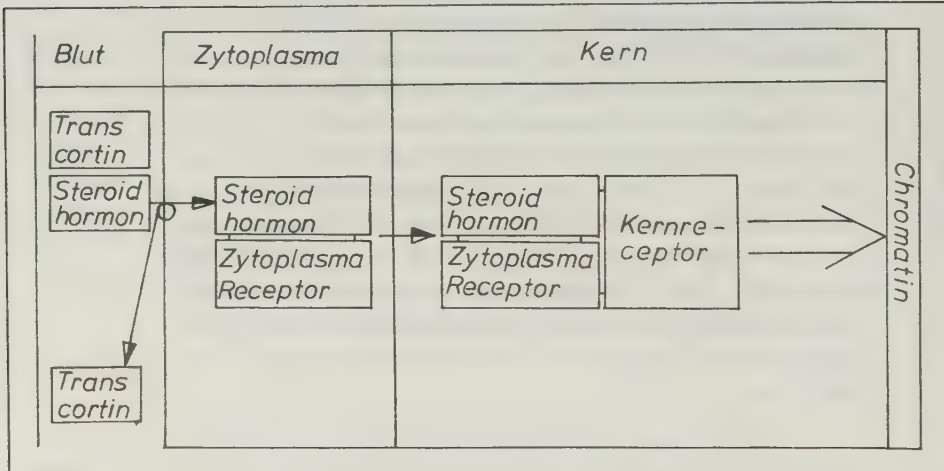


Abb. 2: Am Chromatin löst der Steroid-Zytoplasma-Kernrezeptor-Komplex eine Gen-Derepression und damit eine Aktivierung der DNA-Transskription aus. Die Folge davon ist eine denovo-Synthese spezifischer Proteine (nach 57).

Nach dieser Vorstellung würde der Hormon-Rezeptor-Komplex als Gen-Derepressor (50) wirken. Einen weiteren Fortschritt bei der Erklärung der Wirkungsweise der Steroid-Hormone wird aus der Reindarstellung der Rezeptoren erwartet. Bisher stieß der Versuch auf erhebliche Schwierigkeiten, da sich die Rezeptorproteine als äußerst instabil erwiesen. Nur bei Reindarstellung der Rezeptoren lassen sich jedoch definitive Aussagen über ihre Interaktion mit den Kernkomponenten treffen, auf die sie direkt oder indirekt einwirken: DNA, saure Kernproteine und Histone. Die Reindarstellung der Rezeptoren ist auch deshalb interessant, weil man sich aus dem Vergleich von den Rezeptoren aus normalem Gewebe und solchen aus Tumorgewebe wichtige Informationen darüber erhofft, welche grundlegenden biologischen Unterschiede zwischen normalem und Tumorgewebe bestehen (57).

2. Vitamin-A-Säure

Die physiologische Rolle des Vitamin A besteht in seiner Funktion als Schutzstoff für das gesamte Ektoderm. Struktur und Funktion der epithelialen Gewebe (Haut, Cornea des Auges, Schleimhäute des Respirationstraktes, Digestions- und Urogenitaltraktes) sind Vitamin A abhängig. Vitamin A ist ferner ein Wachstumsfaktor und greift in die Regulation der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität ein. Eine spezifische Rolle spielt das Vitamin A beim Sehvorgang (14). Auf diese Funktion des Vitamins soll in diesem Zusammenhang nicht eingegangen werden.

1913 bewiesen McCollum und seine Mitarbeiter als erste die Existenz eines fettlöslichen Vitamins. Dieses förderte die Gesundheit und das Wachstum von Ratten (67, 68). Diese Substanz fand man in Kabeljau-Leber und im Butter-Fett. McCollum und seine Mitarbeiter bezeichneten diese Substanz als das fettlösliche Vitamin A. Anders als die wasserlöslichen Vitamine scheinen die fettlöslichen Vitamine nur von hochdifferenzierten Organismen, zwischen deren Zellen ein hohes Maß an Arbeitsteilung herrscht, benötigt zu werden (21).

Obwohl bereits seit über fünfzig Jahren bekannt ist, daß Vitamin A zur normalen Differenzierung der Epithelzellen in vielen Organen erforderlich ist (20, 44, 51, 110), sind die molekularen Mechanismen, durch die Vitamin A diesen

Prozeß kontrolliert, immer noch unbekannt. Es gibt eine große Anzahl von Hinweisen, daß andere Strukturen als der Vitamin-A-Alkohol (Retinol) in diesen Prozeß verwickelt sind. Unter diesen Verbindungen mit Vitamin A Wirksamkeit nimmt die Vitamin A-Säure (s. Abb. 3) eine Sonderstellung ein, da sie sich im Stoffwechsel und ihrer biologischen Wirkung anders verhält als Vitamin A-Alkohol und dessen Ester (104, 109). Im Gegensatz zu Vitamin A wird Vitamin A-Säure nicht in der Leber gespeichert, es wird auch nicht zum Aldehyd oder zum Alkohol reduziert (88). Die Symptome der A-Hypervitaminose treten nach Vitamin A-Säure stärker auf als nach Vitamin A-Alkohol, vermutlich infolge mangelnder Speicherung von Vitamin A-Säure im Tierkörper (24, 101). Einige klinische Symptome des Vitamin A Mangels lassen sich durch Vitamin A-Säure Verabreichung nicht beseitigen. In anderen Stoffwechselbereichen dagegen, zum Beispiel im Lipidstoffwechsel der Arterienwand, ist Vitamin A-Säure stärker wirksam als Vitamin A-Alkohol (105). Bisher gelang es nicht, zugeführte Vitamin A-Säure im Organismus oder seinen Ausscheidungen wiederzufinden; die Säure scheint somit rasch metabolisiert zu werden (104).

Einer der wichtigsten Schritte bei der Enträtselung der molekularen Funktionen des Vitamin A war die Synthese von Vitamin A-Säure durch Arens und van Dorp 1946 (1). Von dieser Verbindung nahm man lange Jahre an, daß es sich um ein Analogon von Vitamin A handelt. Man glaubte nicht, daß sie physiologischerweise im Vitamin A Metabolismus auftritt.

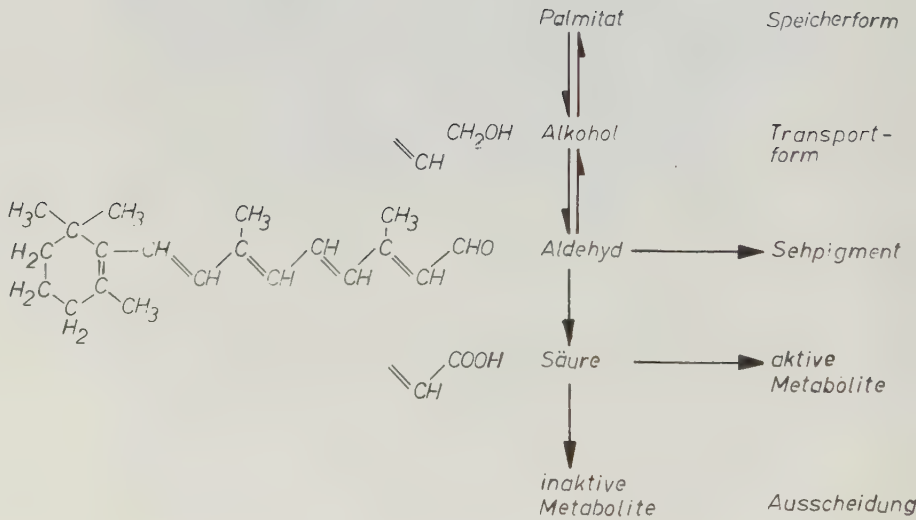


Abb. 3: Vitamin A
Formen und Stoffwechsel (78)

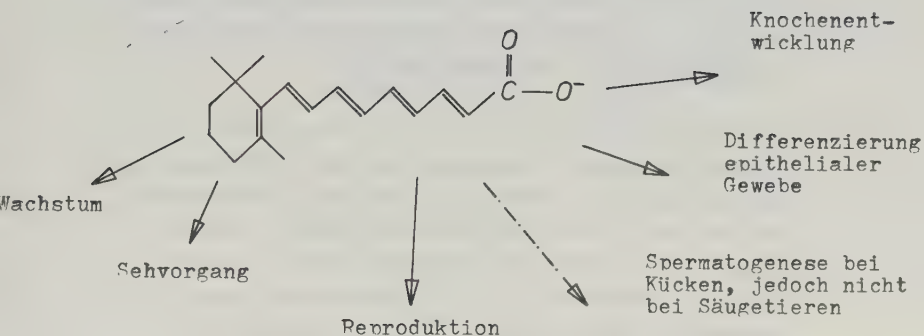


Abb. 4: Biologische Aktivitäten der Vitamin A-Säure (21)

Denn die klassischen Methoden, mit radioaktiv markiertem Vitamin A-Alkohol zu beweisen, daß Vitamin A-Säure ein normaler Metabolit von Vitamin A ist, schlugen fehl (58, 108).

Daher kam es zu der weit verbreiteten Meinung, daß Vitamin A-Säure kein normaler Metabolit von Vitamin A ist. DeLuca und Zile jedoch konnten mit Hilfe einer verfeinerten Methode zeigen, daß Vitamin A-Säure ein normaler Metabolit von Retinol ist. So konnte

nachgewiesen werden, daß das Gewebe Enzyme enthält, die Retinol zu Vitamin A-Säure umwandeln können, wobei NADP als Co-Faktor nötig ist (34, 60, 67). (s.a. Abb. 3) Mit Hilfe der Flüssigkeitsgel-Chromatographie gelang es ihnen weitere Vitamin A-Säure Metaboliten aus Vitamin A-sensiblen Gewebe zu isolieren (21).

Obwohl man nun feststellen kann, daß Vitamin A-Säure als normaler Metabolit im Vitamin A-Säure-Abbau auftritt, darf doch nicht unerwähnt bleiben, daß sich Vitamin A-Säure von den anderen wichtigen Formen des Vitamin A (Retinol, Retinal) in verschiedenen biologischen Eigenschaften unterscheidet: Sie wird nicht über das lymphatische System resorbiert, sondern gelangt über den portalen Kreislauf in die Blutbahn. Sie wird nicht in der Leber gespeichert, sondern rasch über die Galle, mit Glucuronsäure konjugiert, ausgeschieden, und sie vermag nicht in die retinale Pigmentsynthese einzugreifen (21). (s.a. Abb.4)

In vivo Erfahrungen zeigten, daß mit Vitamin A-Säure bei oraler wie auch bei lokaler Verabreichung gute therapeutische Erfolge zu erzielen sind: Bei Akne vulgaris (71, 72, 88, 112), bei Lichen ruber planus (25, 27), in der Tumorthherapie (12, 27, 88), ferner bei verschiedenen Ichtyosisformen, beim Morbus Darier, Psoriasis vulgaris und palmo-plantaren Keratosen (72). Trotz zahlreicher klinischer Erfahrungen ist es noch nicht gelungen, den Wirkungsmechanismus der Vitamin A-Säure befriedigend zu erklären. Nicht unerwähnt sollte

bleiben, daß die Effekte, die ein Defizit bzw. einen Überschuß an Vitamin A auslösen, dieselben sind: Wachstumshemmung, Haut-Abnormalitäten, Knorpel- und Knochendefekte und kongenitale Mißbildungen (55) (s.a. Tab. 1)

	Hauptsymptome und Effekte	ungefähre Tagesdosis (IU/kg/Tag)	
		Ratte	Mensch
Hypovitaminose	Nachtblindheit, Xerophthalmie, Hornhauterweichung, retardiertes Wachstum, follikuläre Hyperkeratose, squamöse Metaplasie verschiedener Epithelien, teratogenetische Effekte, Sterilität	0-50	0-40
Optimale Aufnahme	Normales Wachstum und normale Entwicklung, normaler Ablauf bei der Synthese des Rhodopsins, antikeratinisierender Effekt, normale Reproduktion, Stabilisierung biologischer Membranen	50-500	40-250
Pharmakologische Effekte	Stimulation des Zellwachstums in der Epidermis, der periostalen und endostalen Proliferation, Stimulation der osteoklastischen Aktivität	500-3000	250-2000

	Hauptsymptome und Effekte	ungefähre Tages- dosis (IU/kg/Tag)	
		Rate	Mensch
Toxischer Bereich	Reduktion der Kera- tinbildung, mucö- se Metaplasie mit Stimulierung der Glycogen-Synthese, Labilisierung von biologischen Mem- branen, Verlust lysosomaler Enzyme, Fertilitätsstörungen, teratogenetische Effekte	3000	2000

Tab. 1: Dosisabhängigkeit der verschiedenen
biologischen Effekte von Vitamin A
bei systemischer Anwendung (111)

Die Applikation sehr hoher lokaler Dosen löst tief-
greifende zytologische Veränderungen aus:

- Stimulation der epidermalen Mitosen
- Stimulation der RNA-Polymerase Aktivität
- Zunahme des Turnovers epidermaler Zellen, was
zu einer Epidermisverdickung führt
- Reduzierung der Keratinbildung
- Mucöse Metaplasie mit Stimulation der
Glycoproteinsynthese
- Regression seniler und aktinischer Keratosen und
von Basalzell Karzinomen
- deutliche Entzündung der Haut

All die vorgelegten Ergebnisse jedoch beschreiben nur Effekte, welche Vitamin A-wirksame Verbindungen auszulösen imstande sind. Um den Wirkungsmechanismus der Vitamin A-Säure erklären zu können, unterliegt sie in letzter Zeit intensiven in vitro-Untersuchungen. Christophers konnte nachweisen, daß Vitamin A-Säure im Kulturmedium zu einer starken Stimulation der DNA-Synthese und mitotischen Aktivität bei Epidermiszellen führt (17). In einer vergleichenden Studie über die Wirkung der Vitamin A-Säure auf Fibroblasten, Lymphozyten und Epidermiszellen gelang ihm der Nachweis, daß nur epidermale Zellen die Vitamin A-Säure-Exposition mit einer Steigerung der DNA-Synthese beantworten. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Fibroblasten und Lymphozyten eine Hemmung der ^3H -TdR-Incorporation. Dies spricht für eine hohe Spezifität der DNA-Stimulation in Epidermiszellen (18).

Im Vergleich zu diesem stimulierenden Effekt ist es zunächst überraschend, daß, nach Lasnitzki und Goodman (61), Vitamin A-Säure in der Lage ist, die carcinogenen Effekte von Methylcholanthren zu verhindern. Dieser anticarcinogene Effekt scheint nicht nur auf Methylcholanthren beschränkt zu sein. Auch die Induktion von Lungentumoren durch Benzpyrene läßt sich antagonisieren, in ähnlicher Weise auch die Induktion epidermaler Tumoren bei Mäusen und Kaninchen durch Dimethylbenzanthrazen (11, 74). Deshalb fand die Substanz in letzter Zeit besonderes Interesse. Aus dem oben gesagten läßt sich vermuten, daß möglicherweise sehr unterschiedliche Angriffsorte der Vitamin A-Säure vorliegen.

Eine im Hinblick auf unsere Arbeit interessante Mitteilung machten Sporn et al. (96). Bei Epidermiszellen von neugeborenen Mäusen führt Retinyl-Acetat zu einer signifikanten Zunahme des zellulären RNA-Gehalts. Wird Retinyl-Acetat gleichzeitig mit Hydrocortison ($10,50 \cdot 10^{-6}$ M/ml) und Insulin zum Kulturmedium gegeben, so wird der Retinyl-Acetat Effekt potenziert. Der Gesamtgehalt der zellulären RNA erhöht sich von 40 % auf 108 %.

Auf Grund solcher in vitro-Untersuchungen wird als möglicher Wirkungsmechanismus der Vitamin A-Säure eine direkte Einwirkung auf lysosomale und andere Zellmembranen mit dem Resultat einer Labilisierung angesehen (88).

Trotz der, wie hier geschildert, Vielzahl von vorliegenden Einzelergebnissen und hypothetischen Wirkungsmodellen ist man noch weit davon entfernt, den Wirkungsmechanismus der Vitamin A-Säure auf molekularer Ebene zu verstehen.

3. Thymidin

Thymidin - eine Nucleinsäure - wird bekanntlich nur in die DNA, nicht jedoch in die RNA eingebaut. Da dieser Einbau nur während der identischen Reduplikation in der prämitotischen S-Phase stattfindet, läßt sich mit radioaktiv markiertem Thymidin ($^3\text{H-TdR}$) sehr gut die proliferative Aktivität in einer Zellpopulation verfolgen. Insbesondere erlaubt die Messung der Einbaurrate von $^3\text{H-TdR}$ eine genaue Analyse über den Einfluß einer Substanz auf die Zellproliferation.

Material und Methoden

1. Chemikalien

Die im Versuch verwendete Vitamin A-Säure (Nordmark, Uetersen) lösten wir in Dimethylsulfoxyd (DMSO). Die Endkonzentration von DMSO im Kulturmedium betrug 0,01 %. Die entsprechenden Verdünnungen der Vitamin A-Säure erhielten wir, indem wir sie mit McCoy's 5a verdünnten. In derselben Weise wurde Hydrocortison (Serva, Heidelberg) auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Das zur Auswertung benötigte ^3H -Thymidin (Methyl- ^3H -TdR, Radiochemical Centre Amsterdam) verdünnten wir von einer Anfangskonzentration von 1000 $\mu\text{Ci/ml}$ auf 2 $\mu\text{Ci/ml}$.

Hydrocortison p.A. 99 % Serva Feinbiochemica Heidelberg
Vit. A-Säure /DMSO 0,005 / ml Nordmark Uetersen/Holstein (0,005/ml = 1000 $\mu\text{g/ml}$)
THYMIDINE (methyl-H 3) (aqueous solution, sterilized) 5 Ci/mmol 1ml 1mCi The Radiochemical Centre Amsterdam

Tab. 2

2. Materialien

Die Zellkulturen wurden auf Plastik Petri-Schalen der Firma Falcon (2 ml) angelegt. Während des Versuchs wurden die Petri-Schalen in einer Luft/CO₂-Atmosphäre (95:5 %) bei 37°C gehalten. Das Kulturmedium, McCoy's 5a, die Ca²⁺ und Mg²⁺ freie Lösung, Glutamin, mit dem wir das Kulturmedium anreicherten und Penicillin/Streptomycin erhielten wir von Seromed, München, Trypsin, Versene und das Kälberserum lieferte Biocult, Glasgow Schottland.

Seromed Glutamine 200 mM Membr. Filter steril.
Seromed McCoy's 5a
Seromed Pen./Strept.
Seromed Earle's BSS w/o Calc-Magn
biocult laboratories ltd. Glasgow-Scotland Trypsin 2,5 per cent w/v
biocult laboratories ltd. Glasgow-Scotland Versene-EDTA 0,2 per cent w/v

biocult laboratories ltd.
Glasgow-Scotland
calf-serum

Tab. 3

3. Tiere

Als Tiermaterial verwendeten wir eben geborene Meer-schweinchen (Pirbright), die ein durchschnittliches Gewicht von 80 - 90 g/Tier hatten. Pro Versuch standen uns 16 - 22 Tiere zur Verfügung. Die Tiere wurden mit Hilfe von Äther getötet.

4. Zellgewinnung

Ohren, Lippen und Sohlen der Tiere schnitten wir sorgfältig ab, da diese Teile eine dickschichtige Epidermis besitzen. Um dem Trypsin eine größere Angriffsfläche zu bieten, wurden an den abgeschnittenen Teilen radiale Incisionen vorgenommen. Das auf diese Weise gewonnene Ausgangs-material hatte ein durchschnittliches Gewicht von 14 - 22 g. Dieses Material wurde nach kurzfristiger Vorbehandlung mit 0,02 %iger Versene (Versene 0,02 % und Penicillin-Streptomycin in Ca^{2+} und Mg^{2+} freier Lösung, 5 Minuten bei Zimmertemperatur) trypsiniert. Wir setzten das Material bei $+ 6^{\circ}\text{C}$ 20 Stunden lang einer 0,25 %igen Trypsin-Lösung (versetzt mit 1 % Penicillin-Streptomycin in Ca^{2+} und Mg^{2+} freier Lösung) aus. Im Anschluß daran wurde das Material

im Inkubator eine Stunde lang auf + 37°C erwärmt und dann 50 Minuten bei Zimmertemperatur gerührt. Danach wurde die Trypsinaktivität durch Hinzufügen von eiskaltem, fetalem Kälberserum gestoppt. Filtration durch mehrere Lagen steriler Nylon-Gaze ergab, daß sich in der so erhaltenen Lösung nur noch separierte Zellen vorfanden. Diese Zellen wurden mit dem Kulturmedium (McCoy's 5a) gewaschen und bei 800 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein zweitesmal wiederholt. Das Zentrifugat wurde in McCoy's 5a Lösung so resuspendiert, daß sich eine Zelldichte von 1,0 - 1,5 Mio./mm³ ergab.

5. Anlegen der Zellkulturen

Die Zellen wurden in McCoy's 5a Kulturmedium inkubiert, das durch 10 % Kälberserum, 1 % Penicillin-Streptomycin ergänzt wurde. In die einzelnen Petri-Schalen gaben wir 2 ml und entnahmen die einzelnen Werte als Duplikate bzw. Triplikate.

6. Messung der ³H-TdR-Einbaurate

Eine Stunde vor Entnahme der Proben aus dem Inkubator setzten wir den Kulturen ³H-TdR in einer Konzentration von 2,0 uCi/ml zu. Nach der Entnahme wurde das Kulturmedium abgegossen und die Platten dreimal mit 3 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dann wurden die Zellen von den Platten abtrypsiniert (0,25 %iges Trypsin wirkte 20 Minuten ein), das Material in Zentrifugationsröhrchen abgegossen und die Platten mit

2 ml physiologischer Kochsalzlösung nachgespült. Die so erhaltene Lösung zentrifugierten wir dann (3000 U/min, 20 Minuten), wuschen das Sediment zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung und zentrifugierten erneut. Das Sediment lösten wir in Ameisensäure (500 µl). (bei den ersten Versuchen verwendeten wir zum Lösen 500 µl Hyamin) Diese Lösung wurde dann in 15 ml Szintillationsflüssigkeit (PBD) aufgenommen, das Zentrifugationsröhrchen spülten wir mit 500 µl PBD nach.

Hydroxide of Hyamine 10-X p-(diisobutyl-cresoxyethoxyethyl) dimethyl benzylammonium hydroxy 1 molar solution in methanol
PBD 600 ml Toluol 400 ml Äthylenglycolmonomethyl äther 2-(methoxy)äthanoal $C_3H_8O_2$ Merck 6 g Scintillator Butyl PBD Ciba
Ameisensäure konz. pro analysi Merck

Tab.4

Ausgewertet wurden die von den einzelnen Platten geernteten Zellen im Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (Packard Tricarb Spectrophotometer). Die Ergebnisse geben die counts per minute (cpm) pro Falcon Platte wieder. Sämtliche Versuche wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Dazu errechneten wir den Standard Irrtum (SI).

Ergebnisse

1. Dosisabhängigkeit der Vitamin A-Säure-Stimulation

Aufbauend auf zurückliegenden Untersuchungen von Christophers (17) wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der Einfluß von Vitamin A-Säure auf das Wachstum von Epidermiszellen untersucht. In Übereinstimmung mit der oben zitierten Arbeit fanden wir, daß durch Vitamin A-Säure eine starke Stimulation der DNA-Synthese und der Zellproliferation ausgelöst wird.

Danach untersuchten wir die Frage, ob unterschiedliche Vitamin A-Säure Dosen auch die mitotische Aktivität von in-vitro wachsenden Epidermis-Zellen unterschiedlich beeinflussen.

Konzentration ($\cdot 10^{-6}$ M/ml)	^3H -TdR Einbaurate (cpm)	Kulturdauer (Std)
0.33	3131 $\pm$ 46	48
3.3	5012 $\pm$ 54	48
33.0	5311 $\pm$ 37	48
165.0	1507 $\pm$ 18	48

Tab. 5: Wachstumsverhalten von Epidermis-Zellen unter dem Einfluß verschiedener Vitamin A-Säure Konzentrationen

Tab. 5 und Abb. 5 zeigen deutlich, daß dieser von der Vitamin A-Säure ausgelöste Stimulationseffekt

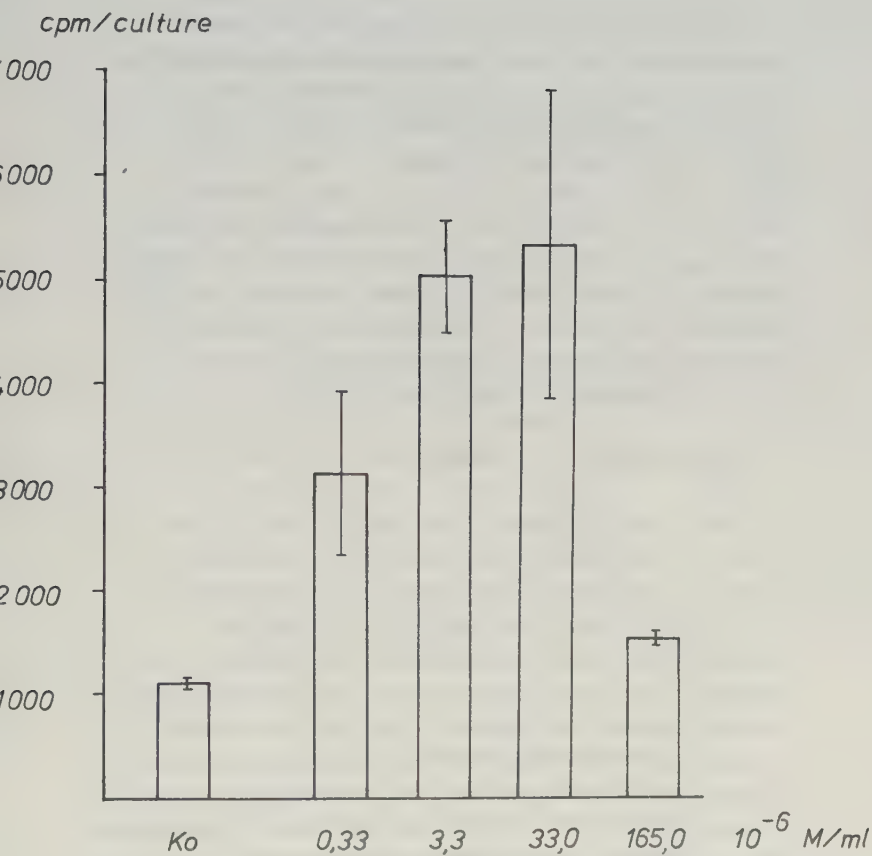


Abb. 5: Wachstumsverhalten von Epidermiszellen unter dem Einfluß verschiedener Vitamin A-Säure-Konzentrationen. Die Kulturen wurden 1 Stunde vor Entnahme der Proben mit 2 uCi/ml ³H-Thymidin inkubiert. Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert und den Standard Irrtum von zwei Kulturansätzen.

konzentrationsabhängig ist. Es zeigte sich bei unseren Versuchen mit kultivierten Meerschweinchen-Epidermiszellen, daß mit steigender Konzentration der Vitamin A-Säure ein ansteigender Stimulationseffekt auslösbar ist. Mit $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml läßt sich ein maximaler Effekt auslösen, der um 372 % über der Kontrollgruppe liegt. Steigert man die Dosis der Vitamin A-Säure im Kulturmedium über diesen Wert hinaus, zeigt sich ein steiler Abfall der radioaktiv markierten Zellen. Bei $165 \cdot 10^{-6}$ M/ml liegt ihre Zahl nur 34 % über der aus der Kontrollgruppe. Der Stimulationseffekt liegt somit nur geringfügig über der Kontrolle, deren Kulturen ohne Vitamin A-Säure wuchsen.

2. Zeitabhängigkeit der Vitamin A-Säure Stimulation

In einer zweiten Reihe von Experimenten legten wir uns die Frage vor, ob der Stimulationseffekt, den Vitamin A-Säure auf Epidermiszellen ausübt, neben seiner Konzentrationsabhängigkeit auch eine zeitliche Abhängigkeit aufweist, d.h. ob die Einwirkungsdauer von Vitamin A-Säure mit dem Stimulationseffekt korreliert ist. Die Zellkulturen wuchsen zunächst (im Gegensatz zu den Experimenten der Abb. 5 und Tab. 5) 24 Stunden im Vitamin A-Säure-freien Kulturmedium. Danach wurden sie für 2, 4, 8 bzw. 12 Stunden dem Einfluß der Vitamin A-Säure ausgesetzt, um nach einem erneuten Mediumwechsel im Vitamin A-Säurefreien Medium weiterzuwachsen. Auf diese Weise waren alle Kulturen bei Analyse

48 Stunden alt. (s. Abb. 6)

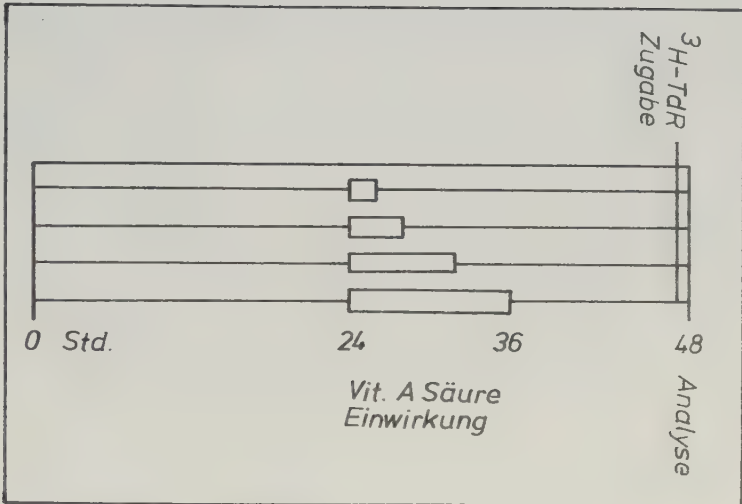


Abb. 6: Flußdiagramm zum Versuchsablauf der Abb. 7

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, daß mit zunehmender Einwirkungsdauer der Vitamin A-Säure ein steigender Stimulationseffekt ausgelöst wird. Da die Kulturen bei Vitamin A-Säure-Zugabe bereits 24 Stunden im Kulturmedium gewachsen sind, kommt es bereits innerhalb der ersten 12 Stunden nach Zugabe zum Anstieg des Stimulationseffektes (vgl. die Ergebnisse der Arbeit 17).

cpm/culture

- 32 -

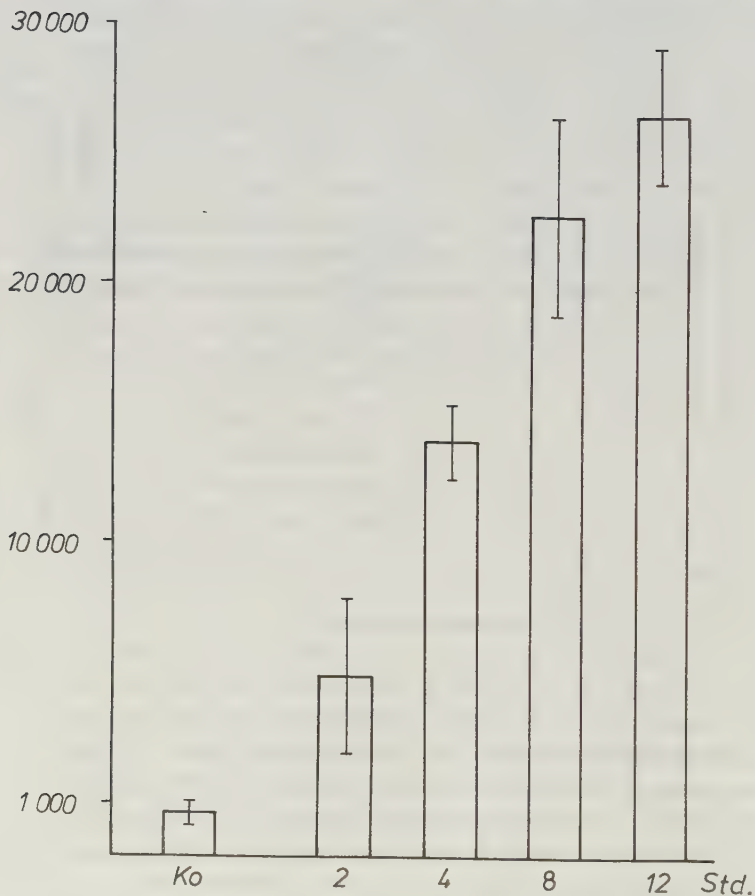


Abb. 7: Wachstumsverhalten von Epidermiszellen bei verschieden langer Vitamin A-Säure Einwirkung.

Die Zellkulturen wuchsen 24 Stunden in McCoys 5a Medium, dann wurden sie verschieden lange der Einwirkung von $33,0 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure ausgesetzt. Nach einem Mediumwechsel wuchsen sie in McCoys 5a Medium weiter und waren so bei Analyse alle 48 Stunden alt.

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert und den Standard Irrtum von zwei Kulturansätzen.

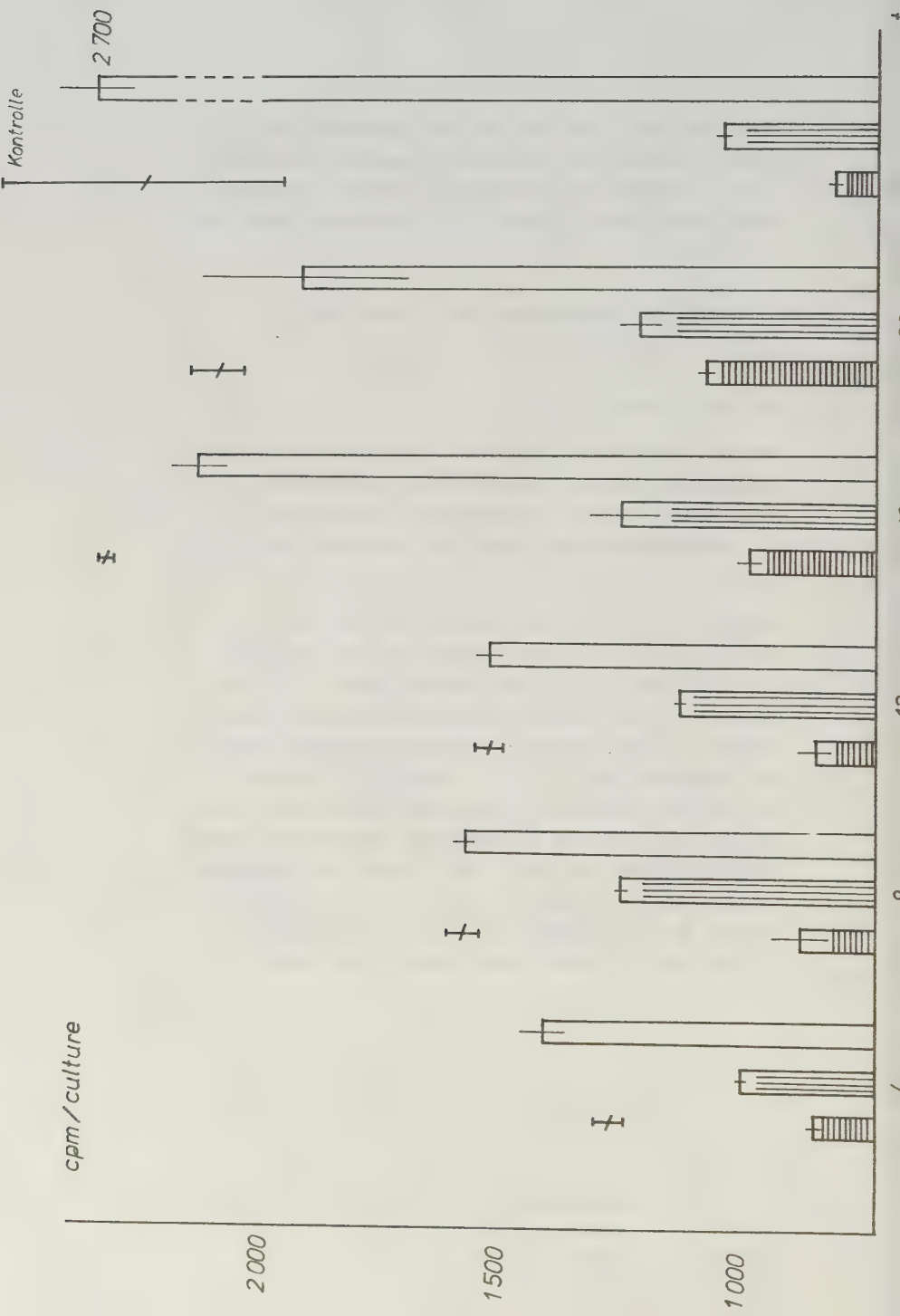
Dabei besteht zwischen der Einwirkungsdauer der Vitamin A-Säure und dem ausgelösten Stimulationseffekt eine nahezu lineare Beziehung. Die Wachstumsstimulation bei Epidermiszellen durch Vitamin A-Säure ist also konzentrations- und zeitabhängig.

3. Wirkung von Hydrocortison auf die mitotische Aktivität von Epidermiszellen.

a. Dosis-Wirkungs-Beziehung

Bei den Untersuchungen über die Effekte, die Hydrocortison auf postembryonale Epidermiszellen *in vitro* ausübt, war es zunächst unser Ziel, festzustellen, ob Epidermiszellen in ihrem Wachstumsverhalten auf die Einwirkung von Hydrocortison ansprechen.

Nachdem die Zellen im Kulturmedium ohne alle Zusätze 24 Stunden gewachsen waren, wurden für 4, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure - für diese Dosis hatten wir zuvor die höchste Stimulationspotenz ermittelt - und verschieden hohe Hydrocortisondosen zugefügt. Die Ergebnisse (Abb. 8 und 9) zeigen, daß bei gleichzeitiger Einwirkung von Vitamin A-Säure und Hydrocortison eine von der Zeitdauer der Einwirkung und der Konzentration abhängige Hemmung der mitotischen Aktivität der Epidermiszellen resultiert. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen hat die Hydrocortisondosis von $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml keinen Einfluß auf den ^3H -TdR-Einbau, ja es scheint sogar ein



Erläuterungen zu Abb. 8:

Die Zellen wuchsen 24 Stunden ohne alle Zusätze.
Danach wurde das Medium gewechselt mit folgenden
Zusätzen:



Hydrocortison $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml
+ Vitamin A-Säure $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml



Hydrocortison $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml
+ Vitamin A-Säure $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml



Hydrocortison $10,5 \cdot 10^{-4}$ M/ml
+ Vitamin A-Säure $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert und den
Standard Irrtum von zwei Kulturansätzen.

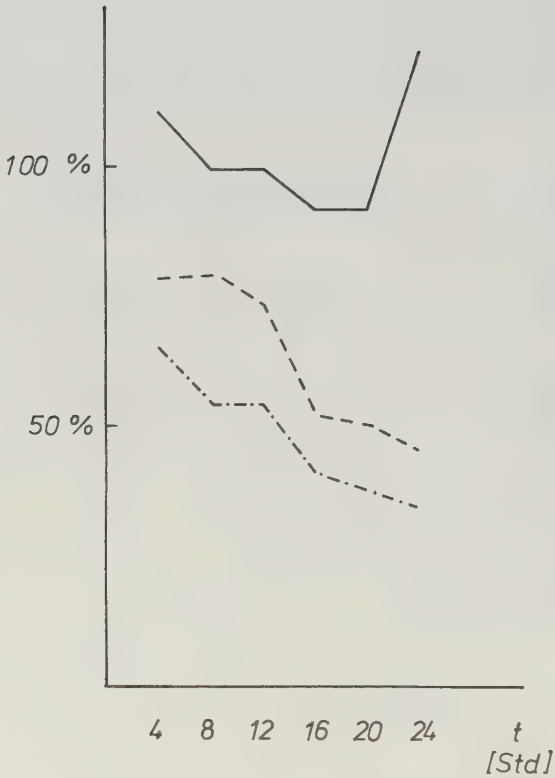


Abb. 9: Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie bei Abb. 8
Die Ordinate gibt den ^3H -TdR-Einbau im prozentualen Vergleich zu den Kontrollen wieder.

———— Hydrocortison $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml
----- Hydrocortison $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml
-.-.-.-.- Hydrocortison $10,5 \cdot 10^{-4}$ M/ml

gewisser potenzierender Effekt der Vitamin A-Säure Wirkung vorzuliegen. Mit $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml Hydrocortison läßt sich der stimulierende Effekt nach 24 Stunden um 57 % im Vergleich zur Kontrollgruppe herabmindern, mit $10,5 \cdot 10^{-4}$ M/ml sogar um 66 % (vgl. Abb. 9). In all unseren Versuchen konnten wir diese starke Hemmung der ^3H -TdR-Einbaurrate trotz optimaler Stimulation mit $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure nachweisen.

Hydrocortison in ausreichender Dosierung verursacht bei Epidermiszellen eine Hemmung der mitotischen Aktivität.

b. Dosis-Zeit-Beziehung

Die Frage des zeitlichen Verlaufs des Hemmeffektes unterzogen wir noch einer genaueren Prüfung. Dabei wollten wir die Frage beantworten, wie lange dauert es, bis eine Hemmung der Einbaurrate von ^3H -TdR durch das Hydrocortison auftritt. Ferner wollten wir wissen, ob der Zeitpunkt, zu dem der Hemmeffekt einsetzt, von der Hydrocortisondosis abhängig ist.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden die Versuchsbedingungen im Vergleich zur vorangehenden Untersuchungsreihe verändert. Die Zellkulturen wuchsen 48 Stunden unter der Einwirkung von $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure. Danach erst wurde Hydrocortison in den angegebenen Dosierungen zum Kulturmedium hinzugegeben. Denn nach 48 Stunden liegt in mit Vitamin A-Säure behandelten Kulturen ein radioaktiver Markierungsindex von 16 - 19 % vor, während in Kulturen, die ohne Vitamin A-Säure Exposition wuchsen, ein radioaktiver

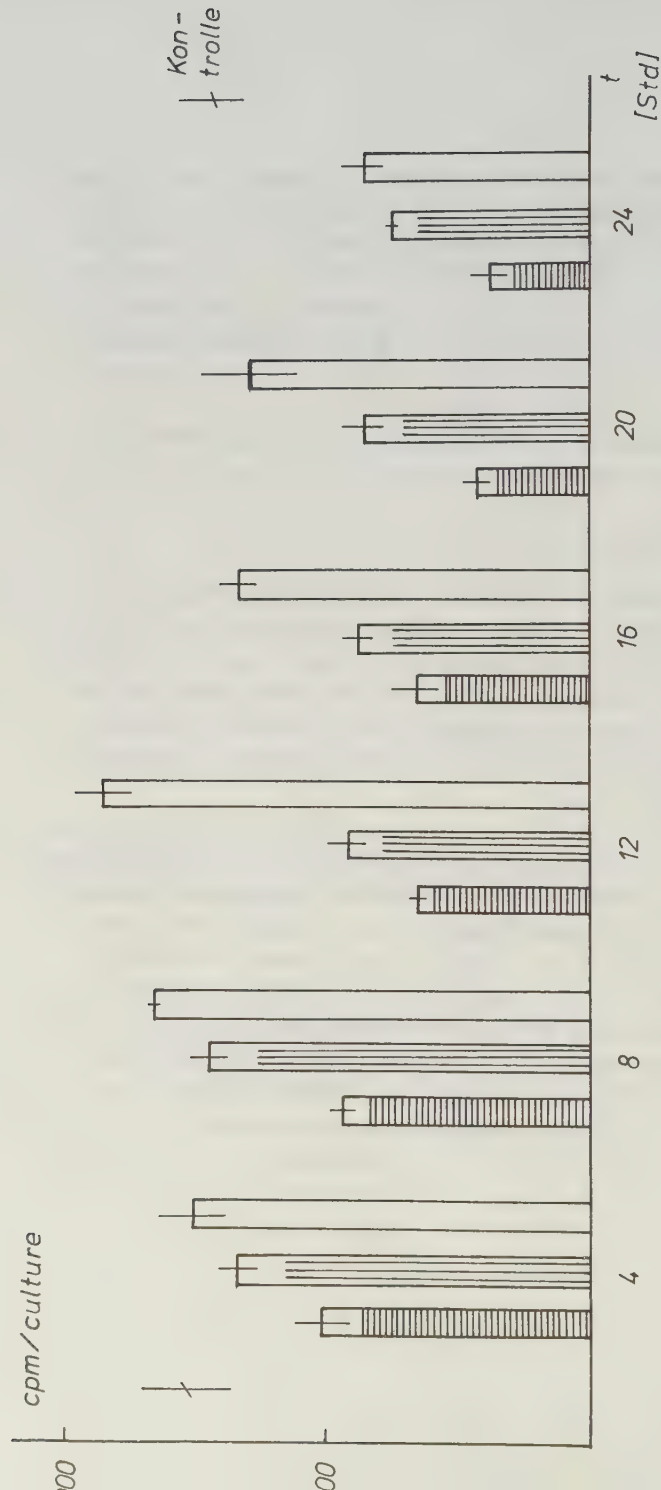


Abb. 10

Erläuterungen zu Abb. 10:

Die Zellen wuchsen 48 Stunden unter der Einwirkung von $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure. Danach wurde das Medium gewechselt und folgende Zusätze beigefügt:



Hydrocortison $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/l
+ Vitamin A-Säure $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml



Hydrocortison $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml
+ Vitamin A-Säure $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml



Hydrocortison $10,5 \cdot 10^{-4}$ M/ml
+ Vitamin A-Säure $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert und den Standard Irrtum von zwei Kulturansätzen.

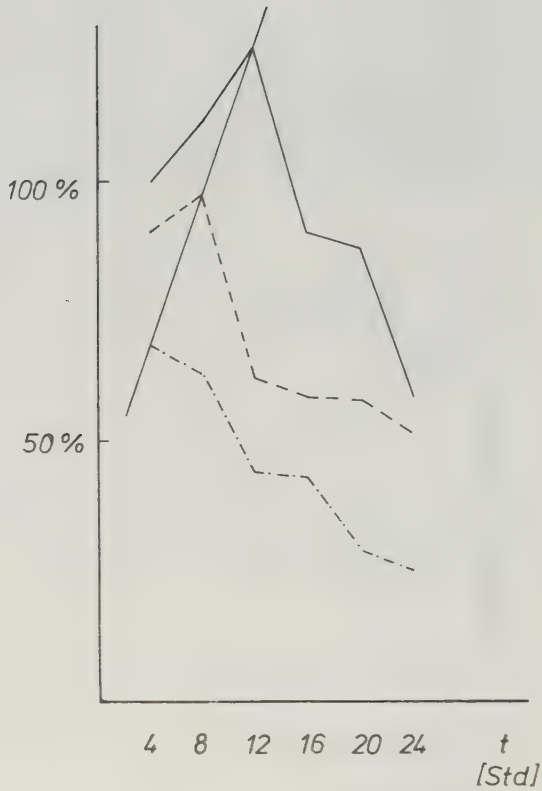


Abb. 11: Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie bei Abb. 10

Die Ordinate gibt den ^3H -TdR-Einbau im prozentualen Vergleich zu den Kontrollen wieder.

—————	Hydrocortison $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml
-----	Hydrocortison $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml
- · - · - · -	Hydrocortison $10,5 \cdot 10^{-4}$ M/ml

Markierungsindex von 13,2 % vorliegt (17). Nach 48 Stunden liegen somit in Vitamin A-Säure behandelten Kulturen ähnliche Bedingungen vor wie in den Kontrollkulturen. Dies erlaubt uns, isoliert den Einfluß des Hydrocortisons zu messen.

Die Ergebnisse (Abb. 10 und Abb. 11) zeigen, daß eine gewisse Latenzzeit verstreicht, bis der Hemmeffekt des Hydrocortisons einsetzt. Aus beiden Abbildungen ist deutlich zu entnehmen, daß die Latenzperiode um so länger dauert, je niedriger die gewählte Hydrocortisondosis ist. Erst bei sehr hohen Hydrocortisondosen kann man keine Latenzzeit mehr feststellen, die Hemmung setzt augenblicklich ein. Zwischen dem Zeitpunkt des Einsetzens der Hemmung der $^3\text{H-TdR}$ -Einbaurate und der Hydrocortisondosis läßt sich eine lineare Beziehung feststellen. Je höher die gewählte Hydrocortisondosis, desto früher setzt der hemmende Effekt ein.

Interessant ist, daß unter den jetzt gewählten Bedingungen auch die niedrige Dosis $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml Hydrocortison den $^3\text{H-TdR}$ -Einbau zu hemmen vermag. Neben diesen Befunden ist aus den Ergebnissen wiederum zu entnehmen, daß die Wirkung der Hydrocortison-Exposition dosisabhängig ist.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, die Epidermiszellen (des Meerschweinchens) gehören zu den steroid-sensitiven Zellen, die in ihrer DNA-Synthese und Zellproliferation durch Hydrocortison gehemmt werden. Der Hydrocortisoneffekt entsteht

durch direkte Einwirkung auf die Epidermiszellen und ist keine Folge des Hydrocortisons in anderen Zellsystemen. Dabei hängt das Ausmaß der Wachstumshemmung und auch der Zeitpunkt des Eintritts des Hemmeffekts deutlich von der Steroidkonzentration ab.

Diskussion

Hydrocortison und Vitamin A-Säure wurden von mehreren Autoren in verschiedenen Gewebesystemen auf ihre Wirkungen hinsichtlich Wachstum, Stimulation oder Hemmung bestimmter Enzyme usw. untersucht (15, 17, 18, 33, 37, 43, 63, 84). Die vorliegende Arbeit sucht einige Effekte dieser Wirksubstanzen in Epidermiszellkulturen zu erhellen, um so mehr, da beide Verbindungen zu den am häufigsten in der Therapie eingesetzten Medikamenten gehören, ihr genauer Wirkungsmechanismus jedoch bis heute unbekannt ist.

Die Ergebnisse bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Epidermiszellen unter verschieden hohen Vitamin A-Säure Expositionen legen die Vermutung nahe, daß die Wirkung der Vitamin A-Säure über einen Enzym-Substrat-Mechanismus vermittelt wird. Die Kurve (Abb. 5) zeigt deutlich ein Substratoptimum bei $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure. Bei noch höheren Substratkonzentrationen könnte neben einer stimulierenden Enzym-Substrat Verbindung eine unwirksame oder wie im vorliegenden Fall eine weit weniger wirksame Enzym-Substrat-Substrat Verbindung entstehen. Die Verbindung besäße nur noch einen Effekt, der wenig über der Kontrollgruppe liegt. Weiterhin konnten wir zeigen, daß unter dem Einfluß von Vitamin A-Säure pro Zeiteinheit gleichviel Epidermiszellen $^3\text{H-TdR}$ einbauen (s. Abb. 7). Auch dieses Ergebnis stützt die Annahme eines Enzym-Substrat Wirkprinzips. Bei solch einem Kurvenverlauf stellt das Enzym den limitierenden Faktor dar, so daß pro Zeiteinheit gleichviel Substrat umgesetzt wird.

Die Untersuchungen über den Einfluß des Hydrocortisons zeigten, daß die ^3H -TdR-Einbaurate in die DNA von Epidermiszellen durch Hydrocortison dosisabhängig gehemmt wird. Wie sich deutlich zeigte, tritt - falls die Kulturen gleichzeitig Vitamin A-Säure und Hydrocortison ausgesetzt sind - erst ab einer Korticoidkonzentration von $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml der Hemmeffekt deutlich zu Tage (s. Abb. 9). Höhere Dosen hemmen rasch und deutlich die ^3H -TdR-Einbaurate.

Um dieses Ergebnis jedoch einordnen zu können, erscheint es uns notwendig, die Empfindlichkeit anderer Gewebe gegenüber Hydrocortison zum Vergleich heranzuziehen (s. Tab. 6). Es zeigt sich deutlich, daß beträchtliche Empfindlichkeitsunterschiede der verschiedenen Zelltypen gegenüber dem Hydrocortison bestehen. Epidermales Gewebe scheint dabei vergleichsweise unempfindlich gegenüber dem Hydrocortison-einfluß zu sein. Verglichen mit anderen Zell-Linien scheint die Cortisoldosis, die zur Reduzierung des Zellwachstums nötig ist, um zwei bis vier Größenordnungen höher zu liegen. Bei lymphatischem Gewebe ist bekannt, daß die Glucocorticoide in sehr niedrigen Konzentrationen zytotoxische Effekte besitzen (107). Die Cortisoldosis, die zur Wachstumshehmung oder Kernlyse nötig ist, liegt bei $0,27 \cdot 10^{-6}$ M/ml. Bei Hepatomzellen, die in Gegenwart des Hormons kultiviert wurden, resultierte bei $0,30 \cdot 10^{-6}$ M/ml Hydrocortison eine 50 %ige Hemmung der ^3H -TdR-Aufnahme (63). Ähnlich signifikant wurde das Fibroblastenwachstum gehemmt bei einer Konzentration von $0,21 \cdot 10^{-6}$ M/ml (10). Auch bei

Zelltyp	Tierspezies	Niedrigste effektive Hydrocortison- konzentration M/ml	Lit.
• Knochenmarkskulturen	Ratten	$0,02 \cdot 10^{-6}$	84
• Balb/c mouse lymphoma cell line S 49	Maus	$0,20 \cdot 10^{-6}$	43
• Thymozyten	Srage- Dawley-Ratten	$0,27 \cdot 10^{-6}$	107
• Lymphosarkomzellen P 1798 S	Maus	$0,27 \cdot 10^{-6}$	102
• Hepatom-Zellen	Morris Hepatoma cells No 5123	$0,30 \cdot 10^{-6}$	63
• Fibroblasten L-Stamm	Maus	$0,50 \cdot 10^{-6}$	73
• Fibroblasten L-Stamm	Maus	$1,00 \cdot 10^{-6}$	89
• Thymuszellen (männliche)	Sprague Dawley-Ratten	$1,00 \cdot 10^{-6}$	37
• Lymphozyten	männliche Wistar-Stamm Ratten	$1,00 \cdot 10^{-6}$	52
• Fetale Lungenzellen	Kaninchen	$5,50 \cdot 10^{-6}$	95
• Epithelzellen der Brustdrüse	Mensch	$10,50 \cdot 10^{-6}$	33
• Primäre Brust-Ca- Zellen	Mensch	$52,50 \cdot 10^{-6}$	15
• Epidermiszellen	Pirbright Meerschweinchen	$2,10 \cdot 10^{-4}$	eigene Ergebn.

Tab. 6: Empfindlichkeit verschiedener Zelltypen gegenüber Hydrocortison, geordnet nach der Hydrocortisonkonzentration, die zur Wachstumshemmung bzw. Proliferationshemmung nötig ist.

Hela-Zellen verursachte die Gegenwart von $7,5 \cdot 10^{-6}$ M/ml eine Abnahme des Markierungsindex um beinahe 50 % (56). Deshalb ist es auffallend, daß bei einer Dosis von $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml dieser Parameter bei Epidermiszellen nicht verändert wird, wenn gleichzeitig $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure auf die Zellen einwirken. Die Einwirkung von Hydrocortison scheint auch in höheren Dosen für Epidermiszellen nicht toxisch zu sein. Weiterhin ist es interessant, daß, wie Smith et al. (95) berichteten, die Wirkung des Hydrocortisons nicht nur von der Konzentration abhängig ist, sondern auch vom Alter der benutzten Kulturzellen. Die Autoren konnten nachweisen, daß fetale Lungenzellen bis zu einem Alter von 22 Tagen durch Hydrocortison eine Wachstumszunahme erfahren. Während im Zeitraum von 24 bis 26 Tagen Hydrocortison keinen Effekt auslöst, hemmt es nach dem 28. Tag das Zellwachstum (95). Die Mechanismen, durch welche die Glucocorticoid-Hormone die DNA-Synthese hemmen, sind unbekannt und können in der Tat von Zelltyp zu Zelltyp verschieden sein. So kann bei Epidermiszellen, wie auch in der intakten Leber, eine Hemmung der DNA-Synthese festgestellt werden, die nicht von einer Zellyse begleitet ist, während die glucocorticoid-induzierte Hemmung der DNA-Synthese in bestimmten lymphatischen Zellen von einer totalen Hemmung der Protein- und RNA-Synthese begleitet ist und den sofortigen Zelltod und eine Gewebeinvolution zur Folge hat. Um die Höhe der Empfindlichkeitsschwelle weiterhin beurteilen zu können, ist es notwendig, sich Klarheit über die normalen physiologischen Werte der

Korticosteroid-Produktion und über den Blutplasmaspiegel zu verschaffen (s. Tab 7).

Hormonproduktion/ 24 h	Blutplasmaspiegel
$2,1 - 4,2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$	$10,5 - 52,5 \cdot 10^{-6} \text{ M/ml}$

Tab. 7: Tagesproduktion und Blutplasmaspiegel von Hydrocortison in vivo (14)

Aus der Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß physiologischerweise niemals die Werte erreicht werden, die notwendig wären, um einen Hemmeffekt auf die mitotische Aktivität von Epidermiszellen hervorzurufen. Die hohe Empfindlichkeitsschwelle der Epidermiszellen könnte verschiedene Ursachen besitzen. Einmal wäre es möglich, daß die Epidermiszellen kein primäres Zielgewebe für die Glucocorticoide darstellen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Mitteilung von Sweat et al. (100), daß Hydrocortison nicht das adäquate Substrat für Epidermiszellen darstellt. Diese Autoren fanden, daß kultivierte menschliche Fibroblasten (U 12-705) Cortisol-4-¹⁴C in eine Vielzahl von Steroidmetaboliten umwandeln. Dies würde die Möglichkeit eröffnen, daß Epidermiszellen auf Hydrocortison nicht optimal antworten, sondern auf ein von den Fibroblasten metabolisiertes Steroidprodukt. Epidermiszellen wären demnach in vivo erst sekundär in den Wirkungskreislauf der Steroid-Hormone eingeschaltet.

Neben der hohen Empfindlichkeitsschwelle der Epidermiszellen gegenüber Hydrocortison konnten wir auch feststellen, daß der Zeitpunkt, zu dem der Hemmeffekt einsetzt, dosisabhängig ist. Je höher die Dosis gewählt wird, um so früher setzt die Hemmung des ^3H -TdR-Einbaus ein (Abb. 11). Dies geht parallel mit Ergebnissen, die Pratt und Aronow (73) vorgelegt haben. Sie fanden, daß bei Mäusefibroblasten (L-Stamm) die ^3H -Thymidin Inkorporation bei einer Cortisolkonzentration von $0,5 \cdot 10^{-6}$ M/ml frühestens sechs Stunden nach der Steroid Applikation deutlich gehemmt wird.

Der von uns gefundenen geringen Steroid-Empfindlichkeit der Epidermiszellen steht die therapeutische Erfahrung gegenüber. So muß der Ort der therapeutischen Wirkung wohl anderweitig gesucht werden. Im Hinblick auf die hohe Empfindlichkeit von lymphatischem Gewebe und der Fibroblasten könnte man diese Gewebe als die primären Angriffsorte für das Hormon ansprechen, die dann die therapeutische Wirkung in der Epidermis hervorrufen.

Jedoch bedarf es noch weiterer Klärung, ob das Hydrocortison das physiologische Substrat für die Epidermiszellen ist bzw. woraus die geringe Empfindlichkeit der Epidermiszellen gegenüber dem Cortisol resultiert. So können die vorgelegten Daten nur als erster Hinweis verstanden werden, ist doch bekannt - insbesondere bei Lymphozyten -, daß von Spezies zu Spezies große Empfindlichkeitsunterschiede bestehen, ja

daß sogar solche innerhalb derselben Spezies auftreten. Ferner können wir unsere Ergebnisse - gewonnen an Epidermiszellen von Nase, Pfoten und Lippen der Meerschweinchen - nicht *a priori* auf die gesamte Oberflächenepidermis übertragen. Robertson et al. (78) fanden nämlich, daß die Rezeptoren für Östradiol am Uterus keineswegs gleichmäßig über das gesamte Organ verteilt sind. Vielmehr zeigte sich, daß Verteilungsmaxima vorliegen. Dies könnte auch bei unseren Epidermiszellen der Fall gewesen sein, so daß wir Gewebe mit einem Minimum an Steroid-Rezeptoren verwendet haben könnten, woraus dann die geringe Empfindlichkeit sich erklären würde.

Unbekannt ist auch, welche Interaktionsmechanismen zwischen der Vitamin A-Säure- und Glucocorticoid-Wirkung bestehen. Wie Abbildung 9 zeigt, hat die Cortisoldosis von $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml keinen Einfluß auf die $^3\text{H-TdR}$ -Inkorporation, wenn gleichzeitig $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure zugefügt wird. Wachsen die Zellen jedoch bereits 48 Stunden unter der Einwirkung von $33 \cdot 10^{-6}$ M/ml Vitamin A-Säure, dann hemmt auch eine Cortisoldosis von $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml nach einer Latenzzeit die $^3\text{H-TdR}$ -Einbaurate (s. Abb. 11). Nach den Ergebnissen der Abbildung 9 könnte es sich um eine Konkurrenzsituation der beiden Substanzen um denselben Rezeptor handeln. Eine Hemmung der $^3\text{H-TdR}$ -Einbaurate tritt deshalb nicht auf, da Vitamin A-Säure in einer etwas höheren Konzentration vorliegt. Gegen diese Vorstellung spricht jedoch, daß bei einer kompetitiven Hemmung die chemische Struktur der beiden

Substanzen gewisse ähnliche Bezirke aufweisen muß, damit sich diese Substanzen mit demselben Rezeptor verbinden können. Dies ist bei der Vitamin A-Säure und Hydrocortison aber offensichtlich nicht der Fall. So könnte es sich um eine allosterische Hemmung handeln, bei welcher das Cortisol das allosterische Zentrum besetzt und die Rezeptorkonfiguration so verändert, daß der stimulierende Effekt der Vitamin A-Säure, die an das aktive Zentrum gebunden ist, nicht zum Tragen kommt.

Befriedigend jedoch läßt sich die Interaktion von Vitamin A-Säure und Hydrocortison nicht erklären, zumal der Effekt der Interaktion davon abhängt, zu welchem Zeitpunkt das Hydrocortison zum Kulturmedium gegeben wird. Interessant ist hierbei ein Bericht von Gospodarowicz (38). Er fand, daß in Verbindung mit dem Wachstumsfaktor FGF - einem Polypeptid, das im Gehirn und in der Hypophyse gefunden wurde - Hydrocortison das Wachstum von Fibroblasten fördert. Seine spekulative Interpretation zielt darauf, daß die Glucocorticoide in eine oder mehrere Komponenten des FGF-Effektor-Systems eingeschaltet sind. Eine bemerkenswerte Möglichkeit bestünde darin, daß die Glucocorticoide die Rezeptorstellen für FGF so modifizieren, daß bei Fehlen der Glucocorticoide keine Rezeptorstellen präsent sind, woraus dann eine geringe Aktivität der FGF resultiert. Auch die fetalen Lungenzellen erfahren - wie bereits erwähnt - durch das Hydrocortison eine Wachstumszunahme.

So sind, trotz der hier vorgelegten und der Vielzahl bereits vorhandener Einzeldaten, noch weitere Untersuchungen nötig, um die Wirkung des Hydrocortisons wie auch der Vitamin A-Säure bzw. beider pharmakologisch aktiver Substanzen an Epidermiszellen verstehen zu können.

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Darstellung der bislang vorliegenden Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus von Hydrocortison bei in vitro gezüchteten Zellen verschiedener Herkunft sowie einem kurzen Überblick über die biologische Rolle von Vitamin A und Vitamin A-Derivaten, insbesondere der Vitamin A-Säure, wird zunächst die Wirkung von Vitamin A-Säure auf 24 Stunden alte in vitro gezüchtete Meerschweinchen-epidermiszellen untersucht. Dabei zeigte sich eine dosis-abhängige Steigerung des ^3H -TdR-Einbaus um etwa das 5fache nach 24 Stunden ständiger Inkubation. Höchste Einbauwerte wurden bei einer Vitamin A-Säurekonzentration von $33,0 \cdot 10^{-6}$ M/ml gefunden, während eine weitere Erhöhung zu einem toxischen Effekt führte.

In Abhängigkeit von der Inkubationsdauer der Zellkulturen mit Vitamin A-Säure von 2 - 12 Stunden zeigte sich ein fast linear verlaufender Anstieg des ^3H -TdR-Einbaus. Diese Steigerung der Vitamin A-Säure induzierten DNA-Synthese ließ sich durch verhältnismäßig hohe Hydrocortison-Konzentrationen in vitro hemmen. Der Hemmeffekt war konzentrationsabhängig und wurde deutlich bei einer Hydrocortisonkonzentration von $2,1 \cdot 10^{-4}$ M/ml. Eine Erniedrigung der Hydrocortisonkonzentration um das 10fache auf $0,21 \cdot 10^{-4}$ M/ml ergab dagegen keine vergleichsweise ausgeprägte Hemmung. Der zeitliche Verlauf dieser Hydrocortison-bedingten Hemmung zeigte, daß mit zunehmender Hydrocortisonkonzentration die Latenzzeit bis zum

Einsetzen des Hemmeffektes kürzer wird.

Die hier erhobenen Beobachtungen werden mit den von anderen Autoren in verschiedenen Geweben gewonnenen Ergebnissen verglichen. Die Empfindlichkeit der Vitamin A-Säure-stimulierten Epidermiszellen liegt um etwa 2zehner Potenzen der verwendeten Cortisolkonzentration niedriger als bei Cortisol-sensiblen Zellen, z.B. Lymphozyten. Da die angewandten Cortisolkonzentrationen auch unter therapeutischen Bedingungen nicht im Gewebe erreicht werden, erscheint eine Cortisolbedingte Hemmung der epidermalen Zellproliferation, beispielsweise bei der Psoriasis vulgaris, zweifelhaft. Zum Abschluß werden die Möglichkeiten diskutiert, die für die vergleichsweise geringe Empfindlichkeit der Vitamin A-Säure stimulierten Epidermiszellen gegenüber dem Cortisol verantwortlich sein könnten.

Literaturhinweise

1. Arcus, J.F. und van Dorp, D.A. (1946)
Activity of 'vitamin-A-acid' in the rat.
Nature 158, 622
2. Ballard, P.L. und Tomkins, G.M. (1970)
Glucocorticoid-induced alteration on the surface
membrane of cultured hepatoma cells.
J.Cell.Biol. 47, 222
3. Ballard, P.L. und Tomkins, G.M. (1969)
Hormone-induced modification of cell surface.
Nature 224, 344
4. Barret, A.J., Sledge, C.B. und Dingle J.T. (1966)
Effect of cortisol on synthesis of chondroitin
sulphate by embryonic cartilage.
Nature 211, 83
5. Baxter, J.D. und Tomkins, G.M. (1970)
The relationship between glucocorticoid binding
and tyrosine aminotransferase induktion in
hepatoma tissue culture cells.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 65, 709
6. Baxter, J.D. und Tomkins, G.M. (1971)
Specific cytoplasmic glucocorticoid hormone
receptors in hepatoma tissue culture cells.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 68, 932
7. Baxter, D.L. und Stoughton, R.B. (1970)
Mitotic index of psoriatic lesions treated with
anthralin, glucocorticoid and occlusion only.
J.invest.Dermatol. 54, 410

8. Beck, G., Poindron, P., Illinger, D., Beck, J.P.,
Ebel, J.P. und Falcoff, R. (1974)
Inhibition of steroid inducible tyrosine amino-
transferase by mouse and rat interferon in
hepatoma tissue culture cells.
Febs Letters 48, 297
9. Befort, J.J., Beck, G. und Beck, L.P. (1974)
Comparison of glucocorticoid cytoplasmic receptors
from liver, Zajdela hepatoma and HTC-cells.
Febs Letters, 45, 179
10. Berliner, D.L. und Ruhmann, A.G. (1967)
Influence of steroids on fibroblasts.
I. An in vitro fibroblast assay for corticosteroids.
J. invest.Dermatol. 49, 117
11. Bollag, W. (1972)
Prophylaxis of chemically induced benign and
malignant epithelial tumors by vitamin A acid
(retinoic acid).
European J. Cancer 8, 689
12. Bollag, W. und Ott, F. (1971)
Vitamin-A-Säure in der Tumorthérapie.
Schweiz.med.Wschr. 101, 17
13. Boulas, S. (1959)
Dissociation of granulation and epithelialization
in wounds of rabbits by means of topically
applied hydrocortisone.
J.invest.Dermatol. 32, 75

14. Buddecke, E. (1971)
Grundriß der Biochemie.
Walter de Gryter & Co Verlag 372
15. Burstein, N.A. und Carey, R.W. (1974)
In vitro assay for human breast cancer hormone
responsivness.
Oncology 29, 470
16. Chang, L.W. und Maibach, H.I. (1967)
Fetal pig skin in organ cultures in dermatologic
investigation.
J.invest.Dermatol. 49, 486
17. Christophers, E. (1974)
Growth stimulation of cultured postembryonic
cells by vitamin A acid.
J.invest.Dermatol. 63, 450
18. Christophers, E. und Langner, A. (1974)
In vitro effects of vitamin A acid on cultured
fibroblasts, lymphocytes and epidermal cells:
a comparative study.
Arch.Der.Forsch. 251, 147
19. Degenhardt, G., Hübener, H.J. und Alester, I. (1961)
Über den Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 323, 278
20. De Luca, L. und Wolf, G. (1968)
Effect of vitamin A on the mucopolysaccarids
of lung tissues.
Arch.biochem.biophys. 123, 1

21. DeLuca, H.F. und Zile, M. (1975)
Aspects of teratology of vitamin A acid (-all-trans retinoic acid)
Acta dermatovener (Stockholm) Suppl. 74, 13
22. Dougherty, T.F. (1952)
Effect of hormones on lymphatic tissues.
Physiol.Rev. 32, 379
23. Dougherty, T.F., Berliner, M.L. und Berliner, D.L. (1962)
Hormonal control of lymphocyte production and destruction.
Prog.Hemat. 3, 155
24. Dowling, J.E. und Wald, G. (1960)
The biological function of vitamin A acid.
Proc.nat.Acad.Sci. 46, 587
25. Ebner, H. und Mischer, P. (1972)
Lokale Vitamin-A-Säure Behandlung des Lichen ruber planus.
Z.Haut-Geschl.Kr. 47, 773
26. Edelman, J.S. und Fimognari, G.M. (1968)
I. Modes of hormone action on the biochemical mechanism of action of aldosteron.
Recent Progr.Horm.Res. 24, 1
27. Evard, J.P. und Bollag, W. (1972)
Konservative Behandlung der rezidivierenden Harnblasenpapillomatose mit Vitamin-A-Säure.
Schweiz.med.Wschr. 102, 1880

28. Fauci, A.S. und Dale, D.C. (1974)
The effect of in vivo hydrocortisone on sub-
population of human lymphocytes.
J.clin.Invest. 53, 240
29. Feigelson, P., Feigelson, M. und Greengard, O. (1960)
First Intern. Congress Endocrinology
Acta endocrin.suppl. 51, 823
30. Fiala, E.S. und Litwack, G. (1966)
Binding of (14)hydrocortison metabolite in liver
supernatant.
Biochim.biophysActa (Amst) 124, 260
31. Fisher, L.B. und Maibach, H.I. (1973)
Topical antipsoriatic agents and epidermal
mitosis in man.
Arch.Dermatol. 108, 374
32. Fisher, L.B. und Maibach, H.I. (1971)
The effect of corticosteroids on human epidermal
mitotic activity
Arch.Dermatol. 103, 39
33. Flaxman, B.A. (1973)
In vitro studies of the human mammary gland:
Effects of hormones on proliferation in primary
cell cultures.
J.invest.Dermatol. 61, 67
34. Futtermann, S. (1962)
Enzymatic oxidation of vitamin A aldehyd to
vitamin A acid.
J.Biol.Chem. 237, 677

35. Gehring, U., Mohit, B. und Tomkins, G.M. (1972)
Glucocorticoid action on hybrid clones derived
from cultured myeloma and lymphoma cell lines.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 69, 3124
36. Geiger, R.S., Dingwell, J.A. und Adrus, W.D. (1956)
The effect of cortisone on the growth of adult
and embryonic tissues in vitro.
Am.J.M.Sc. 231, 427
37. Giddings, S.J. und Youg, D.A. (1974)
An in vitro effect of physiological levels of
cortisol and related steroids on structural
integrity of the nucleus in rat thymic lymphocytes
as measured by resistance to lysis.
J.Ster.Biochem. 5, 587
38. Gospodarowicz, D. (1974)
Localisation of a fibroblast growth factor and
its effect alone and with hydrocortisone on
3T3 cell growth.
Nature 249, 123
39. Granner, D.K., Hayahi, S., Thompson, E.B. und
Tomkins, G.M. (1968)
Stimulation of tyrosin aminotransferase synthesis
by dexamethasone phoshate in cell culture.
J.Mol.Biol. 35, 291
40. Grosser, B.J., Sweat, M.L. und Berliner, D.L. (1962)
und Dougherty, T.F.
Comparison of cortisol metabolism by two variants
of cultured fibroblasts.
Arch.Biochem. 96, 259

41. Grosser, B.I. und Swim, H.E. (1957)
Inhibitory effects of steroids on the growth of
uterine fibroblasts: The isolation of steroid-
restistant variants.
J.Lab.clin.Med. 50, 820
42. Hackney, J.F., Gnoss, S.R., Aronow, L. und
Pratt, W.B. (1970)
Specific glucocorticoid-binding macromolecules
from mouse fibroblasts growing in vitro. A possible
steroid-receptor for growth inhibition.
Molec.Pharmacol. 6, 500
43. Harris, A.W. (1970)
Differentiated functions expressed by cultured
mouse lymphoma cells.
Exptl.cell research 60, 341
44. Hayes, K.C., McCombs, H.L. und Fatherty, T.P. (1970)
The fine structure of vitamin-A-deficiency.
Parotid duct metaplasia.
Lab.Invest. 22, 81
45. Hochschild, R. (1973)
Effects of various additives on in vitro survival
time of human fibroblasts.
J.Geront. 28, 450
46. Horribata, K. und Harris, A.W. (1970)
Mouse myelomas and lymphomas in culture.
Exptlcell res. 60, 61
47. Jacoby, G.A. und La Du, B.N. (1962)
Nonspecificity of tyrosine transaminase: an explantation
for the simultaneous induction of tyrosine,
phenylalanine an tryptophan transaminase activities in rat liver.
Biochem.biophysRes.Comm. 8, 352

48. Joncas, J., Boucher, J., Boudreal, A. und Granger-Julien, M. (1973)
Effect of hydrocortisone on cell viability, Epstein-Barr virus genome expression and interferon synthesis in human fibroblasts cell lines.
Cancer research 33, 2142
49. Jensen, E.V. und Jacobsen, H.I. (1962)
Basic guides to the mechanism of estrogen action.
Recent Progr.Hormone Res. 18, 387
50. Jensen, E.V., Suzuki, T., Numata, M., Smith, S. und DeSombre, E.R. (1969)
Estrogen binding substances of target tissues.
Steroids 13, 417
51. Kaufman, D.G., Baker, M.S., Smith, J.M., Henderson, W.R., Harris, C.C., Sporn, M.B. und Saffiotti, V. (1972)
RNA metabolism in tracheal epithelium: alteration in hamsters deficient in vitamin A.
Science 177, 1105
52. Kinoshita, Y., Kimura, S. und Fukamizu, M. (1974)
Cytolytic effects of glucocorticoid on thymus-medullary lymphocytes incubated in vitro.
Exptl.Cell. Research 87, 387
53. Kirkpatrick, C.H. (1973)
Steroid therapy of allergic diseases.
Med.clin.North America 57, 1309

54. Knox, W.E. (1951)
Two mechanisms which increase in vivo the liver
tryptophan peroxidase activity; specific enzyme
adaption and stimulation of the petuitary adrenal
system.
Brit.J.exptl.Med. 50, 820
55. Kochhar, D.M., Dingle, J.T. und Lucy, J.A. (1968)
The effects of vitamin A (retinol) on cell
growth and incorporation of labelled glucosamine
and proline by mouse fibroblasts in culture.
Exptl.Cell Res. 52, 591
56. Kollmorgen, G.M. und Griffin, M.J. (1969)
Effects of hydrocortisone on cell proliferation
and enzyme induction in Hela cells.
J.Cell Biol. 43, 71a-72a
57. Kornel, L. (1973)
On the effect and the mechanism of action of
corticosteroids in normal and neoplastic target
tissues: findings and hypotheses, with a review
of information on intracellular steroid receptors
in general.
Acta endocrinol. (Suppl)(Kbh) 74, 1
58. Krishnamurthy, S., Bieri, J.G. und Andrews, E.L. (1963)
Metabolism and biological activity of vitamin A
acid in the chick.
J.Nutr. 79, 503
59. Lang, R.F. und Stevens, W. (1970)
Evidence for intranuclear receptor sites for
cortisol in lymphatic tissue.
J.reticuloendoth.Soc. 7, 294

60. Lasnitzki, J. und DeWitt, G. (1974)
Inhibition of the effect of methylcholanthrene
on mouse prostate in organ culture by vitamin A
and its analogues.
Cancer research 34, 1564
62. Leon, H.A., Arrhenius, E. und Hultin, T. (1962)
Effects of glucocorticoid administration on
the incorporation of labelled amino acids into
protein by cell-free rat-liver systems.
Biochim.biophys Acta (Amst) 63, 423
63. Loeb, J.N., Borek, C. und Young, L.L. (1973)
Suppression of DNA synthesis in hepatoma cells
exposed to glucocorticoid hormone in vitro.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 70, 3852
64. Lundin, P. und Jarplid, B. (1973)
Effects of corticosteroid and radiation on lymphoid
tissue in mice. Comparisons and mutual inter-
actions.
Lymphology 6, 158
65. Martin, D.W., Tomkins, G.M. und Bresler, M.A. (1969)
Control of specific gene expression examined in
synchronizied mammalian cells.
Proc.Nat.Acad.Sci. USA 63, 842
66. Martin, D., Tomkins, G.M. und Granner, D. (1968)
Synthesis and induction of tyrosine aminotrans-
ferase in synchronizied hepatoma cells in
culture.
Biochemistry 62, 248

67. Mc Collum, E.V. und Davis, M. (1913)
The necessity of certain lipins in the diet during growth.
J.Biol.Chem. 15, 167
68. Mc Collum, E.V., Simmonds, N. und Pitz, W. (1916)
The relation of the unidentified dietary factors, the fat soluble A and watersoluble B, of the diet to the growth-promoting properties of milk.
J.Biol.Chem. 27, 33
69. Noteboom, W.B. und Gorski, J. (1965)
Stereospecific binding of estrogens in rat uterus.
Arch. Biochem. 111, 559
70. Peterkofsky, B. und Tomkins, G.M. (1967)
Effect of inhibition of nucleic acid synthesis on steroid-mediated induction of tyrosine amino-transferase in hepatoma cell cultures.
J.Mol.Biol. 30, 49
71. Plewig, G. (1972)
Fortschritte der Akne-Behandlung (Vitamin-A-Säure)
Arch.dermat.Forsch. 244, 426
72. Plewig, G., Wolf, H.H. und Braun-Falco, O. (1971)
Lokalbehandlung normaler und pathologischer menschlicher Haut mit Vitamin-A-Säure.
Arch.klin.exp.Derm. 239, 390
73. Pratt, W.B. und Aronow, L. (1966)
The effect of glucocorticoids on protein and nucleic acid synthesis in mouse fibroblasts growing in vitro.
J.Biol.Chemistry 241, 5244

74. Prutkin, L. (1973)
Antitumor activity of vitamin A acid and fluor-
uracil used in combination on the skin tumor,
Keratoacanthoma.
Cancer Res. 33, 128
75. Raina, P.N. und Rosen, F. (1968)
Induction of glutamine synthetase by cortisol.
Biochimbiophys.Acta (Amst) 165, 470
76. Rappay, G., Fazekas, G. und Gyeral, A. (1968)
Effect of hydrocortisone on growth in vitro of
fibroblast like cells derived from rat organs.
Acta med.Acad.Sci.hung. 25, 451
77. Rasche, B. und Ulmer, W.T. (1968)
Glucocorticoidwirkung auf Wachstum und Stoffwechsel
permanenter Fibroblastenkulturen in Abhängigkeit
von Konzentration und Expositionsdauer.
Z.Zellforsch. 84, 506
78. Robertson, D.M., Mester, J., Beilby, J.
Steele, S.J. und Kellie, A.E. (1971)
Measurement of high affinity estradiol receptors
in human uterine endometrium and myometrium.
Acta endocrin. (Kbh) 68, 534
79. Roellinghoff, M. und Wagner, H. (1973)
In vitro induction of tumor specific immunity:
requirements for T-lymphocytes and tumor growth
inhibition in vivo.
Eur.J.immunol. 3, 471
80. Rosen, F., Budnick, L.E., Solomon, D.K. und Nichol, C.A. (1961)
Corticosteroids and transamine activity.
III. A relationship between changes in alanine
transaminase activity and the growth of walker carcinoma 256.
Cancer Research 21, 620

81. Rosen, F., Harding, H.R., Milholland, R.J. und Michol, C.A. (1963)
Corticosteroids and transaminase activity.
3. A relationship between changes in alanine transaminase activity and growth of Walker carcinosarcoma 256.
J.biol.chem. 238, 620
82. Rousseau, G.G., Baxter, J.D., Higgins und Tomkins, G.M. (1973)
Steroid-induced nuclear binding of glucocorticoid receptors in intact hepatoma cells.
J.Mol.Biol. 79, 539
83. Ruhrmann, G. und Berliner, D.L. (1965)
Effects of steroids on growth of mouse fibroblasts in vitro.
Endocrinology 76, 916
84. Rytömaa, T. und Kiviniemi, K. (1969)
The role of stress hormones in the control of granulocyte production.
Cell tiss.Kinet. 2, 263
85. Samuels, H.H. und Tomkins, G.M. (1970)
Relation of steroid structure to enzyme induction in hepatoma tissue culture cells.
J.Mol.Biol. 52, 57
86. Schaumburg, B.P. (1970)
Studies of glucocorticoid-binding protein from thymocytes. 1. Localisation in cell and some properties of protein.
Biochem.biophys.Acta (Amst) 214, 520

87. Schryver, H.F. (1965)
The effect of hydrocortison on chondroitin sulfate production and loss by embryonic chick tibiotarsi in organ culture.
Exptl.cell research 40, 610
88. Schumacher, A. und Süttgen, G. (1971)
Vitamin-A-Säure bei Hyperkeratosen, epithelialen Tumoren, Akne.
Dtsch.med.Wschr. 96, 1547
89. Seifert, R. und Hilz, H. (1966)
Selective and reversible inhibition of proliferation and influence on metabolic functions in L-cells by low cortisol concentrations.
Acta endocr. (Kbh) 53, 189
90. Seiji, M., Nakano, H., Akiba, H. und Kato, T. (1974)
Inhibition of DNA and protein synthesis in melanocytes by a melanoma extract.
J.invest.Dermatol. 62, 11
91. Sharp, G.W.G., Komack, C.L. und Leaf, A. (1966)
Studies of binding of aldosteron in toad bladder.
J.clin.Invest. 45, 450
92. Shisa, H. (1969)
Studies on the mechanism of 7,12-Dimethyl ()-anthracene leukemogenesis in mice.
III. Acceleration of DMBA leukemogenesis in mice by pretreatment of cortisone acetate.
Mie.med.J. 19, 111

93. Siegwart, H.G. (1973)
Vitamin A acid in treatment of oral Lichen Planus.
Arch.Dermatology 107, 277
94. Singh, J., Tsang, K.Y. und Ludwig, G.D. (1974)
Alterations in the mitochondria of human osteo-
sarcoma cells with glucocorticoids.
Cancer research 34, 2946
95. Smith, B.T., Torday, J.S. und Giraud, C.J.P. (1974)
Evidence for different gestation-dependent
effects of cortisol on cultured fetal lung cells.
J.clin.Invest. 53, 1518
96. Sporn, B.M., Dunlop, N.M. und Yuspa, S.H. (1973)
Retinyl acetate: effect on cellular content of
RNA in epidermis cell culture in chemically
defined medium.
Science 182, 722
97. Sugimoto, M. und Endo, H. (1969)
Effect of hydrocortisone on the keratinization
of chick embryo skin cultured in a chemically
defined medium.
Nature 222, 1272
98. Sugimoto, M. und Endo, H. (1971)
Synthesis of epidermal specific proteins se-
lectivly stimulated by hydrocortisone in the
chick embryo skin growing in a chemically
defined medium.
Endocrinol.Japan 18, 457

99. Sulya, L.L., Mc Caa, C.S., Read, V.H. und Bomer, D. (1963)
Uptake of tritiated aldosterone by rat tissues.
Nature (Lond) 200, 788
100. Sweat, M.L., Grosser, B.I., Berliner, D.L., Swim, H.E., Nabors, C.J. und Dougherty, T.F. (1958)
The metabolism of cortisol and progesterone by cultured uterine fibroblasts, strain U12-705.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 28, 591
101. Thompson, I.N. und Pitt, G.A. (1960)
Vitamin A acid and hypervitaminosis A.
Nature (Lond) 188, 672
102. Turnell, R.W., Clarke, L.H. und Burton, A.F. (1973)
Studies on the mechanism of corticosteroid-induced lymphocytolysis.
Cancer Res. 33, 203
103. Weissenfels, I. und Boll, I. (1973)
Einwirkung von Corticosteroiden (Prednisolon-acetat und Triamchinolon) auf menschliches Knochenmark in vitro.
Klin.Wschr. 51, 907
104. Weitzel, G. und Schnapka, G. (1964)
Zur Biochemie der Vitamin A Säure.
Schweiz.med.Wschr. 94, 218
105. Weitzel, G., Wahl, P. und Buddecke, E. (1962)
Antiatherosklerotische Wirkung von Vitamin-A-Verbindungen, Nikotinsäure, -Pyridylverbindungen und Arachidonsäure.
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chemie 327, 109

106. Wells, G.C. (1957)
The effects of hydrocortisone on standardized
surface trauma.
Brit.J.Derm. 69, 11
107. Whitfield, J.F., Perris, A.D. und Youdale, T. (1968)
Destruction of the nuclear morphology of thymic
lymphocytes by the corticosteroid cortisol.
Exptl.cell research 52, 349
108. Wright, G.I. (1961)
(Discussion at a symposium)
Am.J.Clin.Nutr. 9, (4part 2), 26
109. Wolf, G., Kahn, S.G. und Johnson, B.C. (1957)
Metabolism studies with radioaktiv vitamin A.
J.Amer.chem.Soc. 79, 1208
110. Wong, Y.C. und Buck, R.C. (1971)
An electron microscopic study of the metaplasia
of the rat tracheal epithelium in vitamin A
deficiency.
Lab.Invest. 24, 55
111. Zbinden, G. (1975)
Pharmacology of vitamin A acid (-all-trans-
retinoic acid)
Acta dermatovener (Stockh.) Suppl. 74, 21
112. Zehetner, H. (1973)
Akne-Behandlung mit Vitamin A Säure in der Praxis.
Wien.med.Wschr. 123, 426

An dieser Stelle sei Frl. B. Klahre für
ihre ausgezeichnete technische Assistenz
gedankt.

Lebenslauf

Hans-Jürgen L e u t e n m a y r

geboren 14.8.1949 in Augsburg

1955 - 1960	Volksschulbildung
1960 - 1969	Humanistisches Gymnasium St. Stephan in Augsburg
28.6.1969	Reifeprüfung
1970 - 1976	11 Semester a.d. Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität in München in der Fachrichtung Zahnmedizin
23.3.1971	Vorphysikum
17.10.1972	Physikum
14.1.1976	Staatsexamen
seit 1976	Assistenzarztstätigkeit
seit 2.11.1976	zur Ableistung des Wehrdienstes bei der Bundeswehr als Leiter einer Zahnstation

